Concepte de genetică

William S. Klug

Concepte de genetică

A zecea ediție

William S. Klug
Colegiul din New Jersey

Michael R. Cummings
Institutul de Tehnologie din Illinois

Charlotte A. Spencer
Universitatea din Alberta

Michael A. Palladino
Monmouth Uru/effity

booksmedicos.org

Vuelapluma, SL

Revizuire tehnică

realizată de Luis F. Pascual Calaforra,
Departamentul de Genetică, Facultatea de Biologie,
Universitatea din Valencia

PEARSON

Genetică, ediția a zecea
K/ug. VWram S., Cummings. *Michael R., Spencer, Charlotte* A. , *Miladino. Michael A.*

EDUCAȚIA PEARSON. SA. Madrid, 2013

ISBN 978-84-9035-384-4

Subiect: Genetică. 577
Formato: 215 x 270 mm Paginas: 992

Orice formă de reproducere, distribuire, comunicare publică sau transformare a acestei opere poate fi efectuată numai cu autorizația proprietarilor săi , cu excepția cazurilor în care legea prevede altfel. Contactați CEDRO (Centrul Spaniol pentru Drepturi de Reproducere) dacă trebuie să fotocopiați sau să scanați orice parte a acestei opere (www.conlicencia.com ; +34 91 702 1 9 70 / +34 93 272 04 47).

Toate drepturile rezervate.

© PEARSON EDUCACIÓN. SA, 2013
Strada Ribera del Loira, nr. 28
28042 Madrid (Spania) www.pearson.es

Traducere autorizată din ediția în limba engleză, intitulată CONCEPTE DE GENETICĂ. Ediția a I-a de WILLIAM KLUG; MICHAEL CUMMINGS; CHARLOTTE SPENCER; MICHAEL PALLADINO, publicat de Pearson Education, Inc. sub numele de Benjamin Cummings. Drepturi de autor ©2012

Toate drepturile rezervate. Nicio parte a acestei cărți nu poate fi reprodusă sau transmisă sub nicio formă sau prin niciun mijloc, electronic sau mecanic, inclusiv fotocopiere, înregistrare sau prin orice sistem de stocare și recuperare a informațiilor, fără permisiunea Pearson Education, Inc.

Ediție în limba spaniolă publicată de PEARSON EDUCACION SA, Copyright ©2013.

ISBN: 978-84-9035-384-4
Depozit legal : M-1 0066-2013

Echipa editorială :
Redactor: Miguel Martín- Romo
Tehnician editorial: Maria Vázquez

Designer senior: Elena Jaramillo Designer tehnic: Pablo Hoces de la Guardia

Echipa de producție:
Regizor: Marta Illescas
Coordonator: Tini Cardoso

Design copertă: Copibook, SL
Compoziție: Copibook, SL
Tipărit de:

TIPĂRIT ÎN SPANIA

Notă privind *linkurile către site-uri web externe:* Această carte include linkuri către site-uri web a căror gestionare, întreținere și control sunt responsabilitatea exclusivă a unor terțe părți care nu au legătură cu PEARSON EDUCACIÓN, SA. Linkurile sau alte referințe la site-uri web sunt incluse în scop strict informativ și sunt furnizate „ca atare" la momentul publicării, fără nicio garanție expresă sau implicită cu privire la informațiile furnizate în acestea. Aceste linkuri nu implică aprobarea de către PEARSON EDUCACIÓN, SA a acestor site-uri, pagini web, funcționalități și conținutul acestora sau orice asociere cu administratorii acestora. În consecință, PEARSON EDUCACIÓN, SA nu își asumă nicio responsabilitate pentru daunele care pot rezulta din încălcări ipotetice ale drepturilor de proprietate intelectuală și/sau industrială pe care aceste site-uri web le pot conține, nici pentru pierderi, infracțiuni sau daune care decurg, direct sau indirect, din utilizarea acestor site-uri web și a informațiilor acestora. Prin accesarea acestor linkuri externe de pe site-uri web, utilizatorul va fi supus politicilor de protecție a datelor, confidențialității, practicilor și altor conținuturi ale acelor site-uri web și nu ale PEARSON EDUCACIÓN SA.

Această carte a fost tipărită folosind hârtie și cerneluri ecologice.

Acerca de los autores

William S. Klug este profesor de biologie la The College of New Jersey (fostul Trenton State College) din Ewing, New Jersey, unde a ocupat funcția de președinte al Departamentului de Biologie timp de 17 ani. A obținut licența în biologie de la Wabash College din Crawfordsville, Indiana, și doctoratul de la Northwestern University din Evanston, Illinois. Înainte de a se alătura The College of New Jersey, a fost profesor asociat la Wabash College, unde a predat inițial genetică, precum și biologie generală și microscopie. Interesele sale de cercetare s-au concentrat pe studii ultrastructurale și genetice moleculare ale dezvoltării, folosind oogeneza la *Drosophila ca sistem model.* A predat cursuri de genetică și - seminarii avansate de genetică umană și moleculară pentru studenții de biologie timp de peste patru decenii. În 2001, a primit premiul anual inaugural de formare al The College of New Jersey, acordat membrului facultății care „motivează cel mai mult studenții să obțină cele mai mari note". De asemenea, a primit premiul internațional Sigma Pi pentru cel mai remarcabil profesor în 2004, iar în același an a fost nominalizat Educatorul Anului, un premiu acordat de Consiliul pentru Cercetare și Dezvoltare din New Jersey.

Michael R. Cummings este profesor cercetător în cadrul Departamentului de Științe Biologice, Chimice și Fizice de la Institutul de Tehnologie din Illinois, Chicago, Illinois. Timp de peste 25 de ani, a fost membru al Departamentului de Științe Biologice și al Departamentului de Genetică Moleculară de la Universitatea din Illinois, Chicago. De asemenea, a făcut parte din corpul profesoral al Universității Northwestern și al Universității de Stat din Florida. A obținut licența de la Colegiul St. Mary din Winona, Minnesota, iar masteratul și doctoratul de la Universitatea Northwestern din Evanston, Illinois. Pe lângă acest text și volumele însoțitoare, a scris și manuale introductive despre genetică umană și biologie generală. Interesele sale de cercetare se concentrează pe organizarea moleculară și cartografierea fizică a regiunilor heterocromatice ale cromozomilor acrocentrici umani. A predat cursuri universitare de genetică mendeliană și moleculară, genetică umană și biologie generală și a primit numeroase premii pentru excelență didactică, acordate de personalul universității, organizații studențești și studenți absolvenți.

Charlotte A. Spencer este profesor asociat pensionar în cadrul - Departamentului de Oncologie al Universității din Alberta , Edmonton , Alberta, Canada. De asemenea, a fost membră a Departamentului de Biochimie al Universității din Alberta. A obținut licența în Microbiologie de la Universitatea din Columbia Britanică și doctoratul în Genetică de la Universitatea din Alberta , urmat de o formare postdoctorală la Centrul de Cercetare a Cancerului Fred Hutchinson din Seattle , Washington . Interesele sale de cercetare se concentrează pe reglarea transcripției de către ARN polimeraza II în celulele canceroase , în celulele infectate cu virusuri ADN și în celulele care trec prin faza mitotică a ciclului celular . A predat cursuri de biochimie , genetică , biologie - moleculară și oncologie , atât la nivel de licență , cât și la nivel de masterat. De asemenea, a scris eseuri pentru seria *Prentice Hall Exploring Biology* . destinat studenților universitari.

Michael A. Palladino Este decanul Școlii de Științe și profesor asociat în cadrul Departamentului de Biologie de la Universitatea Monmouth din West Long Branch, New Jersey . A obținut licența în biologie de la Trenton State College (acum cunoscut sub numele de The College of New Jersey) și doctoratul în anatomie și biologie celulară de la Universitatea din Virginia . Conduce un laborator activ de cercetare la nivel universitar , unde studenții studiază mecanismele moleculare implicate în imunitatea înnăscută a organelor reproducătoare masculine la mamifere și genele implicate în homeostazia oxigenului și tulburările ischemice ale testiculelor . A predat o gamă largă de cursuri universitare și în prezent predă genetică , biotehnologie, endocrinologie și practică de laborator în biologie celulară și moleculară. A primit numeroase premii pentru abilitățile sale de cercetare și predare , inclusiv Premiul pentru Noul Investigator din partea Societății Americane dc Andrologie , Premiul pentru Profesor Distins din 2005 de la Universitatea Monmouth și Premiul *pentru* Inimă Grijulie din 2005 de la Asociația pentru Cercetare Biomedicală din New Jersey . Este coautor al manualului universitar Introducere *în Biotehnologie* . Este editorul seriei de publicații *„Subiecte* speciale *în biologie "* . de Benjamin Cummings și autorul primei cărți din serie , Înțelegerea *Proiectului Genomului Uman* .

Rezumatul conținutului

PARTEA ÎNTÂI

Genele, cromozomii și ereditatea

1 Introducere în Genetică 1
2 Mitoză și meioză 20
3 Genetică mendeliană 45
4 Extensii ale geneticii mendeliene 77
5 Cartografierea cromozomilor la eucariote 114
6 Analiza și cartografierea genetică la bacterii și bacteriofagi 154
7 Determinarea sexului și cromozomii sexuali 188
8 Mutații cromozomiale: variații ale numărului și aranjamentului cromozomilor 214
9 Moștenire extranucleară 241

DOILEA

ADN-ul: structură, replicare și variație

10 Structura și analiza ADN-ului 260
11 Replicarea și recombinarea ADN-ului 295
12 Organizarea ADN-ului în cromozomi 323

TREILEA

Expresia, reglarea și dezvoltarea genelor

13 Codul genetic și transcripția 346
14 Traducere și proteine 378
15 Mutația genetică, repararea și transpoziția ADN-ului 410
16 Reglarea expresiei genelor la procariote 443
17 Reglarea expresiei genelor la eucariote 468
18 Genetică a Dezvoltării 497
19 Cancerul și reglarea ciclului celular 521

Anexa A Lecturi selectate 828 Anexa B Răspunsuri la probleme selectate 840

Glosar 892

Credite 918

Indice analitic 925

CAPITOLELE SPECIALE DESPRE GENETICA MODERNĂ

Capítulo especial 1 Genetică Forensică 544
Capítulo especial 2 Genomică și medicină personalizată 556
Capítulo especial 3 Epigenetică 570
Capítulo especial 4 Celule stem 583

TRIMESTRU

Genomică

20 Tehnologia ADN-ului recombinant 601
21 Genomică, bioinformatică și proteomică 634
22 Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei 688

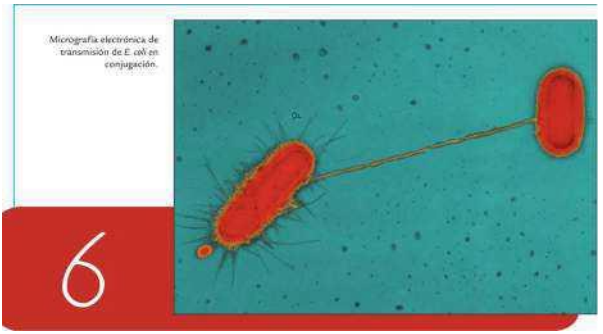
PARTEA A CINCEA

Genetica organismelor și a populațiilor

23 Genetică cantitativă și trăsături multifactoriale 734
24 Genetică comportamentală 757
25 Genetica populațiilor și genetica evolutivă 776
26 Genetica conservării 808

Înțelegerea conceptelor

Abordarea conceptuală a cărții pune accentul pe ideile fundamentale ale geneticii, ajutând elevii să înțeleagă și să-și amintească conceptele cheie.



Analiza și cartografierea ge

n e t i c ă a b a c t e r i i l o r ș i b a c t e r i o f a g i l o r

Prima pagină a fiecărui capitol enumeră conceptele fundamentale , pentru a ajuta elevii să se concentreze asupra ideilor principale ale fiecărui capitol .

Lot genomuri bacteriene* au foarte adesea un singur cromozom circular
Bacteriile au dezvoltat numeroase modalități de a schimba și recombina informații genetice între celule, inclusiv conjugarea, transformarea și transducția.
Capacitatea de a spori conjugarea și de a transfera cromozomul pitic dintr-o celulă în alta este guvernată de prezența informației genetice în ADN a unui factor de „fertilitate" sau factor F.
Factorul F poate acționa autonom în citoplasma bacteriană ca o placă sau se poate lega de cromozomul bacterian, unde facilitează transferul cromozomului de la

celula donatoare la receptor, permiţând recombinarea genetică.
celule care utilizează bacterii ca gazde. ADN-ul bacteriofag este injectat în celula gazdă, unde se reproduce şi dirijează reproducerea bacteriofagului şi a bacteriei.
н În timpul infecţiei cu bacteriofagi, replicarea ADN-ului fagic poate fi urmată de r»con>t>.nac«5n, care poate servi drept bază pentru cartografierea intergemenă şi intragemenă.
În cazuri rare, după infecţie, ADN-ul bacteriofag se integrează în cromozomul gazdă, devenind un profag şi replicându-se de acolo împreună cu ADN-ul bacterian.

Los conceptos fundamentales se revisan con más detalle en la sección Puntos de resumen situada al final de cada uno de los capítulos del libro.

Puncte de rezumat

1. **Recombinarea genetică la bacterii poate avea loc în trei moduri: conjugare, transformare şi transducţie.**
2. **Conjugarea poate fi iniţiată de o bacterie pe care o adăpostesc în Celula adoptă o proteină numită factor F, care o transformă într-o celulă donatoare. După conjugare , - celula receptoare primeşte o copie a factorului F şi intră în starea F.**
3. **Când cromozomul F se integrează în cromozomul din citoplasmă , celula devine donator şi se numeşte celulă Hit. După crossing -over, cromozomul donator se deplasează necontrolat către receptor, iniţiind recombinarea şi oferind baza pentru cartografierea ciclurilor celulare bacteriene .**
4. **Plasmidele , cum ar fi factorul F , sunt molecule de ADN care se replică autonom şi se găsesc în**

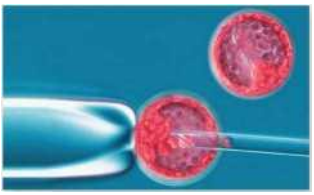
Vedere pură u. thidude. «Nrimariime* *şi* eu uesriones *jir reprim annuite ri arm dr etiudui en* www.nuistmnggrnrlirixom citoplasmă bacteriană. Ocazional, acestea conţin gene distinctive care oferă reestezie antibioticelor*, împreună cu genele necesare pentru transferul fosfatului în timpul conjugării.
5. **Transformarea la bacterii, care nu necesită contact intercelulă, implică intervenţia ADN-ului exogen care pătrunde într-o bacterie receptoare* şi se recombină cu cromozomul gazdă. Este posibilă efectuarea cartografierii linkage-urilor genelor strâns aliniate în timpul analizei* transformării.**
6. **Lм * (virusuri care infectează bacteriile | prezintă un ciclu biologic bine definit, în timpul căruia se reproduc în interiorul celulei gazdă şi pot fi studiaţi folosind testul de chelire.**

Conținut nou și actualizat

Această ediție a fost actualizată complet pentru a include cele mai recente descoperiri pe care studenții trebuie să le cunoască.

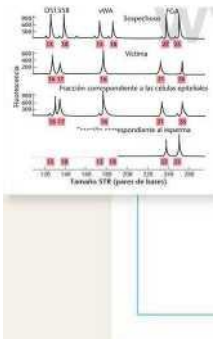
NOU!

Capitolele speciale despre genetică modernă sunt patru mini-capitole originale (situate între părțile 3 și 4), inclusiv Epigenetică, Genomică și medicină personalizată, Celule stem și Științe criminalistice. ▼



CAPITOLELE SPECIALE DESPRE GENETICA MODERNĂ

Genética forense



Incluso muestra» biológicas degradadas por la acción del fuego o el paso del tiempo están proporcionando huellas genéticas que ayudan al sistema judicial a determinar la identidad, la inocencia o la culpabilidad de una persona.

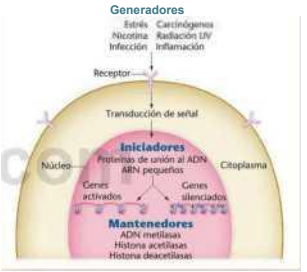
fliwnu» <n l» »iu»lüid, llnlwli rnomMmmi" ". winning»»» Je campo» un dnvnm como la «piral tan. li irqiKolopa. ti dupwXKn

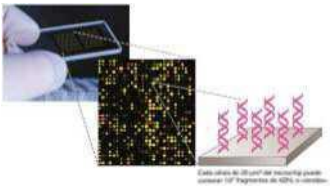
Vu dr b« i»«»» w lu vie» mu prnlundam nli- illr- rada por la grnrtxi mlidrrna r« la tir" u kircnw la ria" da fcnnu utilisa hrrramirnui tvinnlógKii y iwnlifua. pin mpondcr Cweftlone» terrea de lo« bicho» i riamo» < tuoi de caracter criminal o civil Ame» de ISM. Im de" utkui bacate» disponian de un coniunce» de brrr ancien

o wnpachnana opacifie"» Enter naa tarramwMM a" ladeias alguno. mn:«U Hahin. <nmn ri araldi» dal pupo cmpnnro « rl de huella. du»lilan>. paro umhirn muihm cura» smoda» na fiable», como la ancrcucc‡" capilar y la .omparaexe de marra» de «urdidura

Drailr que ar tdCiten *pc* primera »rr en al campaio renar la barila c«Mlua .rai IUHSiRetuadri. l >. la genetica former ie ha convertido «n an metodo de gran importan cia para que la policía identdlque lo» orgeat» de ouierii le» biologico» La huella genetica puedr ahora obtenerte a partir de la salua deluda en lat colilla» de lot clgarn lio» o ln» sello» de correo», a parler de psdua de matti» lochilo muniras hmlOgua» degradadla por la acción del fuego o et paio dii tirapo esita proporcionando huellas genetica» que avadas al interna radioul a dcteeoeinar la idealidad, la laceraci» o ha culpabilidad de una persona Loi inve»ugadores ahora analuaa grande» base» de dato» de perfile, de ADN alma»ruados, coes d fin de encontrar

pr urtai» en» imi radas m la .seras de un criaun La huella pnitin ha permitido de mostrar U moi





NOU!

Tratament actualizat al câmpurilor avansate în tot textul, inclusiv:

- Remodelarea cromatinei.
- Dezvoltarea C. elegans.
- Selecția clonală și cancerul.
- Tehnologii de secvențiere a ADN-ului de ultimă generație.
- Biologie sistemică.
- Studii de asociere la nivelul întregului genom (GWAS).
- Genomuri sintetice.
- Mecanisme moleculare subiacente la comportament.

Pentru o listă completă a tuturor subiectelor care au fost actualizate, consultați Prefața de la paginile XXXI-XXXIV

Rezolvarea problemelor

Accentul pus în carte pe rezolvarea problemelor îi încurajează pe studenți să aplice cunoștințele dobândite *și* să își perfecționeze tehnicile analitice.

EXTINS! Problemele din secțiunile „Rezolvă acum acest lucru" au fost extinse pentru a include enunțul complet al problemei și sunt integrate în capitolul în sine pentru a ajuta elevii să își verifice cunoștințele în timp ce continuă să învețe materialul furnizat în capitol.

ACUM REZOLVĂ ASTA

8.3 Care este efectul unei rare duble încrucișări (a) în cadrul unui segment cromozomial heterozigot pentru o inversiune pericentrică și (b) în cadrul unui segment heterozigot pentru o inversiune paracentrică ?

■ **SUGESTIE :** Această *problemă necesită înțelegerea modului în care omologii suferă sinopsis în prezența unei inversiuni heterozigote , precum și conștientizarea distincției dintre inversiunile pericentrice și paracentrice . Cheia rezolvării acesteia este desenarea tetradei și urmărirea aranjamentului cromatidelor care suferă o dublă încrucișare.*

IDEI ȘI SOLUȚII

bv" *iu a|»S>.* »in* .■ *BttMiKnn* jmn.iu mu *fnttmtu* L. lawynria 4" ll« nlwkmlm «urwxran *ftt* te rwnhnaw *Jt i» gm*

f» u .*vamrr nn* ana^ii p»m Ximtww un mvr nnniulin

pateo* >1/ 'luoootomi fruivi.lr pm te rvinku ul« >l< preNMUU

«nfmpaa qw ten qiM Innur n Ktemun (1 1 Malac» <1 proHr- nu liiululnummlr. I *J) anávat* lM cuvânt, în «imbolo.. «te fmimtn oda «inhibito ate manan pnvna. și <M «tegv și afiliat un eçectlk* tecuca pentru a motect prcMcnu.» Prunetі* óo» pua» tain lau mu neponanin. H al treilea puo *n* ea mare nielliate nittáaauo.

Iată. pirlWrui.1 iute curat» MKI «¿veto. apac pncnuai aaula la lilliliiaualún aae.IMi u urna da: la genei a. iun padcu «"u rui tea picpn.inilii capra aala» «te la» gmuCpo* fi'o Irnailipua ite lai ccneraùiiw» f, » F> Cannate cuumUe un

să-mi ținâ botta .teliate wa p.njilr k» ţauniqn» din» Indi'1 dieta te genti acion P,. Ibi Detrnainr qui gamete» pueden hoinar io» padre» P, (<) Bei ruahi.r Ina ganaclua «aral la alle d mètodo dd «iraadrv ite Pionieri Ù tei diagrama roindUado o. » la alluauate e» muy umfto. piar iiiafa.'.tiain A pwtar te li» grmaXqx» te la peiarraaliili F,. telar mine la» Imolipua la» lai» fenoepM te F,

„mâncare."

paaoamada core .emoţeendti lai buie» tetei.» la gena lian la uuuiniite Pur eenqto. ¿nmulmniu» problema qtuitnlt i n ¿ircwpU'u u. aieb muiawTr rreenm iteci fue Jfml da la^ur rn Uamnipnii ami urrpi mur rarum F_2 ubclmipu Sa «MU Armlv. laUaA *tt* "ruta "i" şi "mutaţi macaraua. <wr" *tată* «T. Ateri, ppar prvpamten /mtepuar pentru a o deschide»

l'ara molar' este problema hay que tmradrr lm ronirp K» ale dominancia y ncmrrtdod. M «orno <1 peinopaai da- la «prp.im AdmUn hay que uiiliira» la mtormaimn «tot <1 patee dd macha Un* manera lógica ate milhes d pelóte-

¡libido a qoe la hembra e» Mui. Ilene qae ier bomoii puica pan el ateto matante iMd. El nuhu c* gril, poe co» eyuiraat debe tener al meno» un «Jeto dominarle < fi> liado

inmuno» poetado*** ate dliliu ateto, ail q«ae Ilene que w he InvdgOU» I M>.
A parar ate aqnc rendi w el problema ea muy i ingte

El» vacopune ogro-Mlh. grh haxnxişbUca hMertxlgóCteo

ft ft Wi

1/2 do hetera» igotiei» griteiMi. iruchot y haentni — F, 1/2 ale ttomocigóuei» te negru, irada si femele

▲ Exercițiile includ o sugestie pentru îndrumarea studenților, iar un răspuns scurt este prezentat în Anexa B.

◄ Secțiunile Idei și Soluții consolidează abilitățile elevilor de rezolvare a problemelor, prezentând soluții pas cu pas și raționamentul din spatele rezolvării problemelor selectate.

Probleme și întrebări pentru discuții

Problemele și întrebările de discuție de la sfârșitul fiecărui capitol includ diferite niveluri de dificultate, iar majoritatea pot fi atribuite studenților din cadrul cursului MasteringGenetics. Întrebările „De unde știm?" le cer studenților să identifice și să examineze baza experimentală pentru mai multe concepte importante. Au fost adăugate altele noi.

În acest capitol, ne-am concentrat mai întâi pe informația că ADN-ul este materialul genetic și am explicat structura ADN -ului, așa cum a fost propusă de Watson și Crick. De asemenea , am discutat despre metoda „dezvoltată" utilizată pentru sintetizarea ADN-ului. În timpul acestui proces , am întâlnit numeroase ocazii de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații . Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspuns ați propune la următoarele întrebări fundamentale?
a) Cum au reușit oamenii de știință să stabilească faptul că ADN-ul, și nu o altă moleculă, acționează ca material genetic în bacterii și bacteriofagi?
I b) De unde știm că ADN-ul acționează și ca material genetic în organismele exogene, cum ar fi ființele umane ? I Cum s-a stabilit că structura ADN-ului este o dublă spirală în care cele două lanțuri sunt ținute împreună prin legături de hidrogen formate între bazele azotate ?
De unde știm că C> este asociat cu C și că A este asociat cu T pe măsură ce se formează perechile de baze ? secvențe repetitive de ADN în organismele eucariote ?

„Funcția" atribuită* modelului genetic *cu reproducere, represiune, stocare și mutație. Ce tonuri le atribuie fiecare

Conti nuare Citat Talli duyi rulen trah» prob.

(rupt)
7. Ziua în care Al tico'
8. ¿Ce ADN-ul

D-.bu **nuil»**

<Cu IIMÙ

Probleme suplimentare picante

M. News *Advance* **: *1 martie 2020.* O creatură extrasă în timpul explorării spațiului cosmic a fost descoperită . Recent, materialul său genetic a fost izolat și analizat. Acest material este similar cu ADN-ul în anumite aspecte, în ceea ce privește compoziția sa chimică. Conține abundentă entrozā cu 4 atomi de carbon și un echivalent molar de grupări fosfat. În plus, conține șase baze azotate: adeninā (A), guaninā (G), timinā (T), clorozinā (C), hipoxantinā (H) și ioninā (X). Aceste baze sunt prezente în următoarele proporții relative:**

ATH și CGX

Studiile de difracție cu raze X au stabilit că molecula este regulată și are un diametru constant de aproximativ 30 Å. Luate împreună, aceste date sugerează un model pentru structura acestei molecule.
(a) Propuneți un model general al acestei molecule. Descrieți-l pe scurt.
(b) Ce proprietăți de potrivire a bazei trebuie să existe pentru H și pentru X în model?
(c) Având în vedere diametrul constant de 30 Å, credeți că *fie* (i) atât H, cât și X sunt purine* sau ambele pirimidine, *fie* (ii) una este o purină, iar cealaltă este o pirimidină?

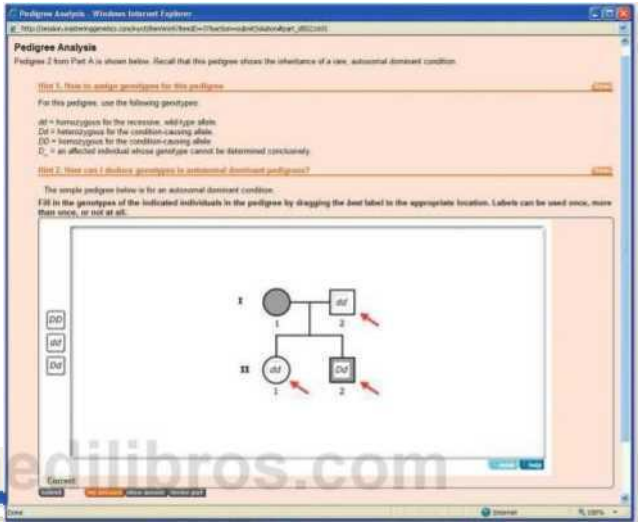
probleme cu această a zecea ediție

Problemele Extra Picante îi provoacă pe elevi să rezolve probleme complexe, multe dintre ele bazate pe date extrase din articole de cercetare genetică.

NOU! Exersați rezolvarea problemelor

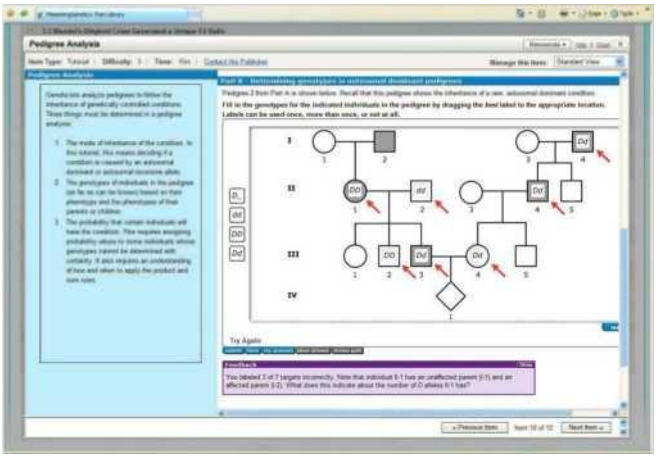
probleme cu MasteringGenetics

Această carte este acum disponibilă pe MasteringGenetics, un sistem online puternic de învățare și evaluare care s-a dovedit eficient în a ajuta elevii să dobândească abilități de rezolvare a problemelor.


Pedigree Analysis
Pedigree Analysis
Pedigree 2 from Part A is shown below. Recall that this pedigree shows the inheritance of a rare, autosomal dominant condition.
For this pedigree, use the following genotypes:
dd = homozygous for the recessive, wild-type allele
Dd = heterozygous for the condition-causing allele
DD = homozygous for the condition-causing allele
D_ = an affected individual whose genotype cannot be determined conclusively
The simple pedigree below is for an autosomal dominant condition.
Fill in the genotypes of the indicated individuals in the pedigree by dragging the text label to the appropriate location. Labels can be used once, more than once, or not at all.
DD
dd
Dd
I
II
Correct

Los tutoriales en profundidad, que se centran en conceptos genéticos fundamentales, refuerzan las habilidades de resolución de problemas con sugerencias y realimentación específicas de los errores que los estudiantes vayan cometiendo. Los temas de los tutoriales incluyen el análisis de genealogías, el ligamiento al sexo, las interacciones génicas, la replicación del ADN y muchos otros.

www.medilibros.com


Pedigree Analysis
Pedigree 2 from Part A is shown below. Recall that this pedigree shows the inheritance of a rare, autosomal dominant condition.
Fill in the genotypes for the indicated individuals in the pedigree by dragging the text label to the appropriate location.
Labels can be used once, more than once, or not at all.
I
II
III
IV
D_
dd
DD
Dd
Try Again

Întrebările selectate cu valori aleatorii oferă automat fiecărui elev valori diferite pentru o anumită întrebare, asigurându-se astfel că își finalizează lucrarea. Aceste întrebări sunt identificate printr-o pictogramă în biblioteca de elemente MasteringGenetics.

Învățare activă și cooperativă

Această ediție include mai multe oportunități pentru profesori și elevi de a se implica în învățarea activă și cooperativă.

STUDIU DE CAZ | A încerca sau a nu încerca

Thomas

a descoperit un aspect potențial teribil al istoricului familiei sale când a aflat de diagnosticul medical al fratelui său, care indica demență progresivă, rigiditate musculară crescândă și convulsii din ce în ce mai frecvente . Fratele său în vârstă de 49 de ani a fost diagnosticat cu boala Huntington (BH), o afecțiune moștenită dominant și care începe să se manifeste cu aceste simptome în jurul vârstei de 45 de ani, ducând la deces la scurt timp după împlinirea vârstei de 60 de ani. Deși vestea a fost devastatoare pentru Thomas, ea a ajutat cel puțin la explicarea sinuciderii tatălui său. Thomas, la 10 ani, se întreabă acum care este probabilitatea de a fi purtător al genei bolii Huntington, așa că el și soția sa discută despre posibilități și...

Dezavantajele testării genetice: Thomas și soția sa au doi copii adolescenți, un băiat și o fată.
Ce rol poate juca un consilier genetic *în* acest caz real?
J. Cum pot ajuta pregătirea și analiza unei genealogii familiale la rezolvarea dilemei cu care se confruntă Thomas și familia sa?"
3. Dacă Thomas decide să se supună unor teste genetice, ce rol ar trebui să joace agentul de asigurări de sănătate în acest caz?
4. Dacă Thomas are un rezultat pozitiv la testul pentru boala Huntington și ești unul dintre copiii lui, ai vrea și tu să fii testat?

◄ NOU! Studii de caz au fost adăugate la sfârșitul fiecărui capitol, permițând elevilor să citească și să răspundă la întrebări despre un scenariu scurt legat de unul dintre subiectele capitolului. Studiile de caz leagă tratarea conceptelor genetice normale de problemele sociale de zi cu zi.

EXPLORARE

Explorarea genomicii" îi ajută pe studenți să aplice genetica în tehnici moderne precum genomica, bioinformatica și proteomica. Aceste casete ilustrează modul în care studiile genomice influențează fiecare aspect al geneticii. Exercițiile pun întrebări care provoacă la reflecție și îi îndrumă pe studenți către resurse online conexe, permițându-le să își extindă cunoștințele despre genomică.

Moștenirea mendeliană online la om

Eu ■» i .Sunt» din nimbi inpbnuMn al (frauKru)

Moștenirea Deliană la Om (OMIM) este un catalog de gene umane și boli genetice umane care sunt

debotai

respectiv l. neinclus Baza de date OMIM este o versiune actualizată zilnic din cartea Menfr
Are Mrnbnvt w Mm «dit .do po< d O». Victor Mctumk, din U >ohfls Hophin» Unhmuty LoteicranuMutiltunOMIM qua rompfemantan În»

pentru a obține o cantitate mare de informații, inclusiv secvențe de ADN și proteine, hărți cromozomiale, descrieri *ale* boiilor și afecțiuni clinice relevante. În acest exercițiu, va trebui să explorați OMIM

anemia falciformă, precum și alte boli moștenite pe cale Mendehana

În acest capitol am prezentat trăsăturile „umane", atât naturale, cât și dominante. Vom afla acum mai multe despre anemia falciformă, o boală autoimună, explorând baza de date OMIM.
1. Pentru a începe căutarea, accesați site-ul web OMIM la adresa: www.
bara de instrumente kgifdb-OMIMaitooi*

<+603909)

pubfcudo» <n Puh M rd

Binqunda

Pentru intrare, răspundeți la următoarele întrebări:
Este Coolie gena mutantă la copiii care suferă de attenua falci fnme?
b Sunt principalele simptome - ale acestei boli în cazul sindromului Cullet?*
Ce a fost publicat?
d Descrieți alte două caracteristici ale acestei boli pe care le-ați aflat din baza de date OMIM și d în ce parte a bazei de date ați găsit informațiile.

Exercițiul II. O altă fermă

recesivas o dominantes
Seleccione otra enfermedad humana que se herede en forma de carácter recesivo o dominance e investigue sus caracteristicas

responder a enfermedad

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Proyectos genómicos personales y la carrera por conseguir un genoma po

◄ Eseurile Genetică, tehnologie și societate reflectă descoperirile recente din domeniul geneticii și impactul pe care aceste descoperiri îl au asupra societății. Acestea includ o secțiune intitulată „ *Rândul tău",* care îi îndrumă pe studenți către resurse conexe, cum ar fi articole scurte și site-uri web, pentru a-i ajuta să investigheze mai departe și să se angajeze în discuții pe această temă.

Contenido

Prefață *XXXI*

PARTEA ÎNTÂI
GENE, CROMOZOMII ȘI MOȘTENIRE

Introducere în Genetică 1

1.1 Genetica are o istorie bogată și interesantă 3
1600-1850 : Zorii biologiei moderne 3
Charles Darwin și Evoluția 4

1.2 Genetica a progresat de la Mendel la ADN în mai puțin de un secol.
Teoria cromozomială a moștenirii 4
Variație genetică 6
Investigarea naturii chimice a genelor : ADN sau proteine? 6

1.3 Descoperirea dublei helixuri a inițiat era geneticii moleculare 7
Structura ADN -ului și ARN-ului 7
Expresia genelor : de la ADN la fenotip 7
Proteine și funcție biologică 8
Legătura dintre genotip și fenotip: anemia falciformă 8

1.4 Dezvoltarea tehnologiei ADN-ului
Clonarea recombinantă a inaugurat era clonării 9

1.5 Impactul biotehnologiei este creștere 10
Plante, animale și aprovizionare cu alimente 1 0
Cine deține organisme modificate genetic ? 1 1
Biotehnologia în genetică și medicină 12

1.6 Genomica, proteomica și bioinformatica sunt domenii noi și în expansiune. 13

1.7 Studiile genetice depind de utilizarea organismelor model 14
Seria actuală de organisme model în genetică 14
Organisme model și boli umane 1 5

1.8 Trăim în era geneticii 15
Premiul Nobel și Genetica 16
Genetică și societate 1 6

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE
Implicațiile științifice și etice ale geneticii moderne 17

■ EXPLORÂND GENOMICA
Resurse de internet pentru învățarea despre genomică, bioinformatică și proteomică 1 8
Puncte de rezumat 19
Probleme și întrebări pentru discuții 19

Mitoză *și* meioză 20

2.1 Structura celulei este intim legat de funcția genetică 21

2.2 În organismele diploide, cromozomii formează perechi omoloage 23

2.3 Mitoza distribuie cromozomii între celulele fiice 26
Interfaza și ciclul celular 26
Pro 27
Prometafaza și metafaza 29
Anafaza 29
Telofaza 30
Reglarea ciclului celular și punctele de control 30

2.4 Meioza reduce numărul de cromozomi de la diploid la haploid în celulele germinale și spori 31
Prezentare generală a meiozei 31
Prima diviziune meiotică: profaza I 33
Metafază, anafază și telofază I 34
A doua diviziune meiotică 35

2.5 Dezvoltarea gameților variază în timpul spermatogenezei și oogenezei 35

2.6 Meioza este esențială pentru reproducerea sexuată la toate organismele diploide 37

2.7 Microscopia electronică a dezvăluit structura fizică a cromozomilor mitotici și meiotici 39

EXPLORÂND GENOMICA
PubMed: Explorarea și accesarea literaturii biomedicale 40

STUDIU DE CAZ Timpul este totul 41

Puncte de rezumat 41

Idei și soluții 42

Probleme și întrebări pentru discuții 43

Genetică mendeliană 45

3.1 Mendel a folosit un model experimental pentru a aborda studiul tiparelor de moștenire 46

3.2 Încrucișarea monohibridă dezvăluie modul în care o trăsătură este transmisă din generație în generație 47
Primele trei principii ale lui Mendel 48 Terminologia genetică actuală 49
Abordarea analitică a lui Mendel 50
Pătratul Punnett 50
Crucea de test: 50 de caractere

***33 de ani* Încrucișarea dihibridă a lui Mendel generează un raport F_2 distinctiv 51**
Al patrulea postulat al lui Mendel : segregarea independentă 52
Crucea de testare : două caractere 53

3.4 Încrucișările trihibride demonstrează că principiile lui Mendel sunt aplicabile moștenirii mai multor trăsături 53
Diagrama de ramificare sau metoda schemei de ramificare 55

3.5 Opera lui Mendel a fost redescoperită la începutul secolului al XX-lea. 57
Teoria cromozomială a moștenirii 57
Factori, gene și cromozomi omologi 58

3.6 Transmiterea independentă are ca rezultat o mare variație genetică 59

3.7 Legile probabilității ne ajută să explicăm fenomenele genetice 60
Teorema binomului 61

3.8 Analiza chi-pătrat evaluează influența șansei asupra datelor genetice 62
Calculele chi -pătrat și ipoteza nulă 63
valorilor de probabilitate 64

3.9 Genealogiile umane dezvăluie tipare de moștenire a trăsăturilor 66
Acorduri referitoare la genealogii 66
Analiza genealogică 67

■ EXPLORAREA GENOMICII
Moștenirea mendeliană online la om 69

STUDIU DE CAZ A încerca sau a nu încerca 69

Puncte de rezumat 70
Idei și soluții 70

Probleme și întrebări pentru discuții 72

Extensii ale geneticii mendeliene 77

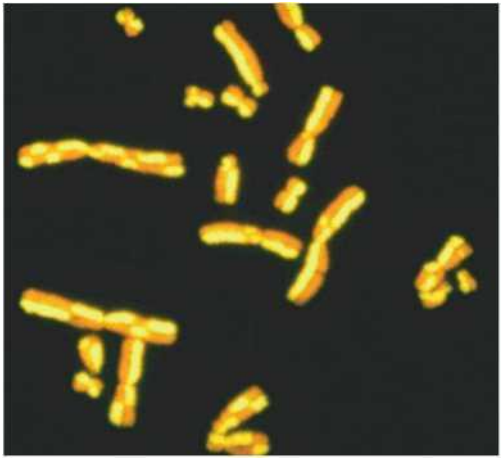
4.1 Alelele modifică fenotipurile în diverse moduri 78

4.2 Geneticienii folosesc o mare varietate de simboluri pentru alele 79

4.3 Cu dominanță incompletă sau parțială, niciuna dintre alele nu este dominantă 80

4.4 În codominanță, influența ambelor alele la heterozigoți este foarte evidentă. 81

4.5 Într-o populație pot exista gene cu alele multiple 81
Grupa sanguină ABO 81
Antigenele A și B 82
Fenotipul Bombay 82
Locusul alb al *Drosophilei 83*



4.6 Alelele letale sunt gene esențiale 84

4.7 Combinațiile a două perechi de gene implicate în două moduri de moștenire modifică raportul 9:3:3:1 86

4.8 Adesea, fenotipurile sunt afectate de mai mult de o genă 86

Epistază 87 Fenotipuri noi 91

Alte rapoarte dihibride modificate 92

4.9 Analiza complementării ne permite să determinăm dacă două mutații care dau naștere aceluiași fenotip sunt alele ale aceleiași gene 93

4.10 Expresia unei singure gene poate avea efecte multiple 94

4.11 Legătura X descrie genele de pe cromozomul X 95

Legătura X în *Drosophila 96*

Legătura X la om 97

4.12 În moștenirea limitată de sex, sexul individului influențează fenotipul. 98

4.13 Fundalul genetic și mediul pot modifica expresia fenotipică 99

Penetrare și expresivitate 99

Context genetic: efecte de poziție 1 00

Efectele temperaturii: o introducere în mutațiile condiționate 100

Efectele Nutriției 101

Debutul expresiei genelor 101

Anticiparea genetică 102

5.1 Genele legate de pe același cromozom se separă împreună 115

Raportul de legătură 1 1 6

5.2 Încrucișarea ca bază pentru determinarea distanței

Amprentarea genomică (paternă) și reducerea la tăcere a genelor 102

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

Îmbunătățirea destinului genetic al câinilor de rasă pură 104

STUDIU DE CAZ Dar nu este surd 105

Puncte de rezumat 105

Idei și soluții 106

Probleme și întrebări pentru discuții 108

5 Cartografierea cromozomială în eucariote 114

dintre gene în construirea hărților cromozomiale 118

Morgan și încrucișarea 118 Sturtevant și cartografierea genetică 120

Treceri simple 121

5.3 Determinarea secvenței genetice în realizarea unei hărți se bazează pe analiza încrucișărilor multiple 122

Treceri multiple 122

Hartă în trei puncte la Drosophila *123 Determinarea* ordinii genelor 125 O problemă de cartografiere la porumb 127

5.4 Pe măsură ce distanța dintre două gene crește, estimările cartografierii devin mai puțin precise 130

Interferență și coeficientul de coincidență 131

5.5 Genele Drosophilei au fost cartografiate pe larg 132

5.6 Scorarea Lod și analiza hibridizării celulelor somatice au fost importante din punct de vedere istoric pentru cartografierea cromozomilor umani 132

5.7 Cartografierea cromozomilor este acum posibilă folosind markeri ADN și baze de date adnotate 135

5.8 Încrucișarea implică un schimb fizic între cromatidele 136

5.9 Schimburile au loc și între cromatidele surori 137

5.10 La organismele haploide, analiza linkage-ului și cartografierea pot fi efectuate 138

Harta genei - la -centromer 139

Analiza tetradelor ordonate și dezordonate 141 Legături și mapare 141

5.11 A găsit Mendel o legătură? 144

■ EXPLORAREA GENOMICII Hărți ale cromozomilor umani pe internet 145

STUDIU DE CAZ Relația cu autismul 146 Puncte de rezumat 146

Idei și soluții 147

Probleme și întrebări pentru discuții 149

Analiza și cartografierea genetică la bacterii și bacteriofagi 154

6.1 Bacteriile mută spontan și cresc exponențial 1S5

6.2 Recombinarea genetică are loc la bacterii 157

Conjugarea la bacterii: descoperirea tulpinilor F* și F 157

Bacterii Hfr și hărți cromozomiale 159 Recombinarea în încrucișările F* XF ⁻: recenzie 162

Starea F' și merozigoții 164

6.3 Proteinele Rec sunt esențiale pentru recombinarea bacteriană 165

6.4 Factorul F este un exemplu de plasmidă 165

6.5 Transformarea este un al doilea proces care are ca rezultat recombinarea genetică la bacterii 166

Procesul de transformare 166

Transformare și gene legate 168

6.6 Bacteriofagii sunt virusuri bacteriene 168 Fagul T4: structură și ciclu de viață 1 68

Analiza petelor de chelie 170

Lizogenie 1 70

6.7 Transducția este un transfer de ADN bacteriană prin intermediul unui virus 170

Lederberg -Zinder 1 72

Natura transducției 1 72

Transducție și hărți 174

6.8 Bacteriofagii suferă recombinare intergenică 174

Mutații bacteriofage 1 74

Hărți în bacteriofagi 1 75

6.9 Recombinarea intragenică are loc în fagul T4 176

Locusul *HI* al fagului T4 176

Complementare prin mutații *HI* 177

Analiza Recombinării 1 78

Testul de ștergere a locusului *HI* 1 79

genei *HI* 179

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE De la genele holerei la vaccinurile comestibile 1 81

STUDIU DE CAZ Tratament sau netratament 182

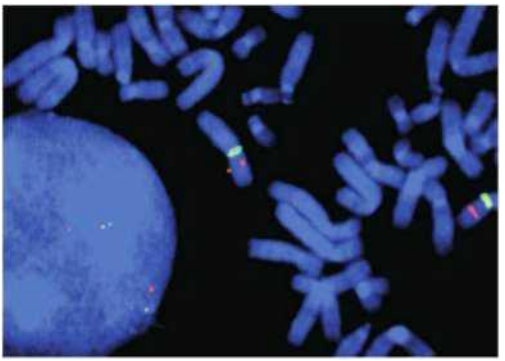
Puncte de rezumat 182

Idei și soluții 183

Probleme și întrebări pentru discuții 184

Determinarea sexului și cromozomii sexuali 188

7.1 Ciclurile biologice depind de diferențierea sexuală 189 Chlamydomonas 189



Zea mays 190
Caenorhabditis elegans 192

7.2 Cromozomii X și Y au fost asociați pentru prima dată cu determinarea sexului la începutul secolului al XX-lea. 193

7.3 Cromozomul Y determină masculinitatea la oameni 194
Sindroamele Klinefelter și Turner 1 94
Sindromul 47,XXX 195
47,XYY Condiție 196 Diferențiere sexuală la oameni 196
Cromozomul Y și dezvoltarea masculină 197

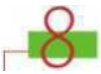
7.4 Raportul dintre masculi și femele în specia umană nu este 1,0 199

7.5 Compensarea dozei previne supraexprimarea genelor legate de X la mamifere 200
Corpuri Barr 200
Lyon 201
Mecanismul de inactivare 203

7.6 Proporția cromozomilor X în raport cu complementul de autozomi determină sexul la *Drosophila* 204
Compensarea dozei la *Drosophila* 206
Mozaicuri în *Drosophila 207*

7.7 Variația temperaturii reglează determinarea sexului la reptile 207

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE
O chestiune de gen : selecția sexului la oameni 209 STUDIU DE CAZ Problema unui câine! 210 Puncte de rezumat 210 Idei și soluții 211
Probleme și întrebări pentru discuții 211



Mutații cromozomiale: variații ale numărului *și* aranjamentului cromozomilor 214

8.1 Variația numărului de cromozomi: terminologie și origine 215

8.2 Monosomia și trisomia au ca rezultat diverse efecte fenotipice 216
Monosomia 216
Trisomia 217
Sindromul Down : trisomia 21217
Originea cromozomului 21 suplimentar în sindromul Down 218
Aneuploidia umană 220

8.3 Poliploidia, în care se găsesc mai mult de două seturi haploide de cromozomi, este predominantă la plante 220 Autopoliploidia 221
Alopoliploidie 222
Endopoliploidie 224

8.4 Variații apar în structura și aranjamentul cromozomilor 224

8.5 O deleție este pierderea unei regiuni a cromozomului 225
Sindromul Cri-du-chat la om 226

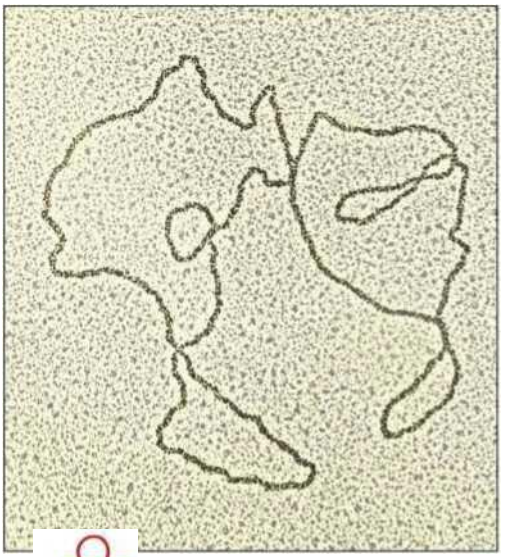
8.6 O duplicație este un segment cromozomial repetat 227
Redundanță și amplificare genetică: gene ARN ribozomal 227
Mutația Baren *la Drosophila* 228
Rolul duplicărilor genice în evoluție 228

8.7 Inversiile rearanjează secvența liniară a genelor 229
Consecințele investițiilor în formarea gameților 230
Avantajele evolutive ale investițiilor 231

8.8 Translocațiile modifică amplasarea segmentelor cromozomiale în genom 232 Translocații la specia umană: sindromul de
Sindromul Down familial 233

8.9 La om, zonele fragile sunt susceptibile la rupturi cromozomiale 234 Sindromul X fragil (sindromul Martin-Bell) 234 Relația dintre zonele fragile și cancer 235

■ EXPLORAREA GENOMICII
Atlas de genetică și citogenetică în oncologie și hematologie 236
STUDIU DE CAZ Povești cu pești 236
Puncte de rezumat 237
Idei și soluții 237
Probleme și întrebări pentru discuții 238



9

Herencia extranuclear 241

9.1 Moștenirea organitelor implică ADN-ul cloroplastelor și mitocondriilor 242
Cloroplaste: variegație în floarea de la ora patru 242
Cloroplaste: mutații la *Chlamydomonas* 243 Mutații mitocondriale: primele studii asupra *Neurospora* și a drojdiei 244

9.2 Cunoașterea ADN-ului mitocondrial și cloroplastic ne ajută să explicăm moștenirea organelelor 246
ADN -ul organitelor și teoria endosimbiotică 246
Organizarea moleculară și produsele genetice ale ADN-ului cloroplastic 247
Organizarea moleculară a produselor genetice ale ADN-ului mitocondrial 248

9.3 Mutațiile din ADN-ul mitocondrial duc la boli la oameni 250 Mitocondriile, sănătatea umană și îmbătrânirea 25 1

9.4 În efectul matern, genotipul mamei are o mare influență asupra dezvoltării timpurii 252
Pigmentarea în *Efesia* 252

10.1 Materialul genetic trebuie să prezinte patru caracteristici 261

10.2 Până în 1944 , observațiile au favorizat proteinele ca material genetic. 262

10.3 Dovezile în favoarea ADN-ului ca material genetic au fost obținute inițial prin studiul bacteriilor și
Înfășurare în *Limnaea* 253
Dezvoltarea embrionară la *Drosophila* 254

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE
ADN-ul mitocondrial și misterul Romanovilor 255
STUDIU DE CAZ O diferență între gemeni 256
Puncte de rezumat 256
Idei și soluții 257
Probleme și întrebări pentru discuții 257

DOILEA
ADN-ul: Structură, Replicare și Variație

10

Structura și analiza ADN 260

bacteriofagilor 262 Transformarea: studiile inițiale 262
Transformare: Experimentul Avery, MacLeod și McCarty 264
Experimentul Hershey-Chase 266
Experimente de transfecție 267

10.4 Dovezi indirecte și directe susțin conceptul că ADN-ul este materialul genetic la eucariote 269
Distribuția ADN-ului 269
Dovezi indirecte: mutageneză 269
studii ADN recombinant 270

10.5 ARN-ul servește drept material genetic în unele virusuri 270

10.6 Cunoașterea chimiei acizilor nucleici este esențială pentru înțelegerea structurii ADN-ului 271
Nucleotide: elementele constitutive ale acizilor nucleici 271
Nucleozide difosfat și trifosfat 273
Polinucleotide 273

10.7 Structura ADN-ului este esențială pentru înțelegerea funcției sale 274
compoziția bazelor 275
Analiza prin difracție de raze X 275
Watson și Crick 276

10.8 Există forme alternative de ADN 280

10.9 Structura ARN-ului este chimic similară cu cea a ADN-ului, dar monocatenară. 282

10.10 Multe tehnici analitice au fost utile în timpul investigării ADN-ului și ARN-ului 283
Absorbția luminii ultraviolete (UV) 283
Comportamentul de sedimentare 283
Denaturarea și renaturarea acizilor nucleici 285
Hibridizare moleculară 286
Hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH) 287
Cinetica de reasociere și ADN repetitiv 287
Electroforeza acidului nucleic 288

■ EXPLORAREA GENOMICII
Introducere în bioinformatică: BLAST 289

STUDIU DE CAZ Câteva fapte despre virusul variolei 291
Puncte de rezumat 291
Idei și soluții 291
Probleme și întrebări pentru discuții 292

Replicarea și recombinarea ADN 295

11.1 ADN-ul GEI se reproduce prin replicare semiconservativă 296
Experimentul Meselson-Stahl 297 Replicarea semiconservativă la eucariote 298 Origini, furci de replicare și unități de replicare 299

11.2 Sinteza ADN-ului la bacterii implică cinci polimeraze și alte enzime 301 ADN polimeraza I 301
ADN polimerazele II, III, IV și V 302

113 În timpul replicării ADN-ului, trebuie rezolvate multe probleme complexe. 304
Decolizarea helixului ADN 304
Inițierea sintezei ADN-ului folosind un primer ARN 305
Sinteza continuă și discontinuă a ADN-ului 305
Sinteza pe căile conducătoare și întârziată este simultană 306
Detectarea și corectarea erorilor au loc în timpul replicării ADN-ului 307

11.4 Un model coerent care rezumă replicarea ADN-ului 307

11.5 Replicarea este controlată de o varietate de gene 308

11.6 Replicarea ADN-ului la eucariote este similară cu replicarea la procanote, deși mai complexă 308
Inițiere la origini multiple de replicare 309
Multiplele ADN polimeraze eucariote 309
Replicarea prin cromatină 310

11.7 Capetele cromozomilor liniari sunt problematice în timpul replicării 311
Structura telomerilor 311
Replicarea la telomerul 312

11.8 Recombinarea ADN-ului, cum ar fi Replicarea ADN-ului este dirijată de diverse enzime 314
Conversia genetică, o consecință a recombinării ADN-ului 316

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE
Telomerii: cheia nemuririi? 317

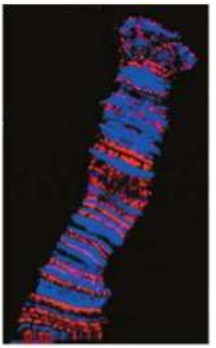
STUDIU DE CAZ Capete libere 318
Puncte de rezumat 318
Idei și soluții 319
Probleme și întrebări pentru discuții 319

Organizarea ADN-ului în cromozomi 323

12.1 Cromozomii virali și bacterieni sunt molecule de ADN relativ simple 324

12.2 Superînrăsucirea facilitează compactarea ADN-ului în cromozomii virali și bacterieni 326

12.3 Cromozomii specializați prezintă variații în organizarea ADN-ului 327



Cromozomi politeni 327

Cromozomi perie sau peniforme 329

12.4 ADN-ul este organizat în cromatină la eucariote 330

Structura cromatinei și a nucleozomilor 330 Remodelarea cromatinei 333

Heterocromatina 334

12.5 Bandarea cromozomială diferențiază regiunile de-a lungul cromozomului mitotic 335

12.6 Genomurile eucariote prezintă o organizare complexă de secvențe caracterizată prin ADN repetitiv 336

ADN satelit 336

Secvențe de ADN centromerice 338

Secvențe de ADN telomeric 338

Secvențe moderat repetitive : VNTR și STR 339

Secvențe transpuse repetitive : SINE și LINE 339

Gene multicopie moderat repetitive 340

12.7 Marea majoritate a genomului eucariot nu codifică gene funcționale 340

■ EXPLORAREA GENOMICII

Baza de date cu variante genomice : variații structurale ale genomului uman 340

STUDIU DE CAZ Arta ca inspirație pentru învățare 341

Puncte de rezumat 342

Idei și soluții 342

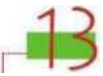
Probleme și întrebări pentru discuții 343

13.2 Studiile inițiale au stabilit modelele de funcționare de bază ale codului 348

Natura tripletă a codului 348. Natura nesuprapusă a codului 349. Natura degenerată, fără virgulă, a codului 349

13.3 Munca lui Nirenberg, Matthaei și a altora a condus la

TERCERA PARTE
Expresia, reglarea și dezvoltarea genelor



Codul genetic și transcripția 346

13.1 Codul genetic folosește baze ribonudeotidice drept „litere” 347

descifrarea codului 350. Sinteza polipeptidelor într- un sistem lipsit de

350 de celule

Codurile homopolimerilor 351

Amestec de copolimeri 351

Tehnica de îmbinare a tripletului 352

Copolimeri repetitivi 353

13.4 Dicționarul de coduri dezvăluie câteva modele interesante printre cei 64 de codoni.

Degenerarea și ipoteza oscilației 355

Natura ordonată a codului 356

Inițiere, terminare și ștergere 356

13.5 Codul genetic a fost confirmat în studiile asupra fagului MS2 357

13.6 Codul genetic este aproape universal 357

13.7 Puncte de inițiere diferite creează gene care se suprapun 358

13.8 Transcripția sintetizează ARN pe un șablon de ADN 359

13.9 Studiile cu bacterii și fagi au furnizat dovezi ale existenței ARNm 359

13.10 ARN polimeraza dirijează sinteza ARN 360

Promotorii , legătura cu mucegaiul și subunitatea rr 362

Inițierea, alungirea și terminarea sintezei ARN 362

13.11 Transcripția la eucariote diferă de transcripția procariotă în mai multe moduri 363

Inițierea transcripției la eucariote 364 Descoperiri recente despre funcția ARN polimerazei 365

ARN nuclear eterogen și procesarea sa: capace *și* cozi 366

13.12 Regiunile codificatoare ale genelor eucariote sunt întrerupte de secvențe intercalate 366

Mecanismele de tăiere și îmbinare: ARN-uri autocatalitice 368

Mecanisme de tăiere : spliceosomul 368

13.13 Editarea ARN poate modifica transcrierea finală 370

13.14 Transcrierea a fost vizualizată folosind microscopia electronică 371

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Reducerea la tăcere a genelor pe bază de acid nucleic: atacarea mesagerului 372

STUDIU DE CAZ Un medicament care uneori funcționează 373

Puncte de rezumat 373

Idei și soluții 374

Probleme și întrebări pentru discuții 374

14

Traducere *și* proteine 378

14.1 Traducerea ARNm depinde de ribozomi și ARN-uri de transfer 379

Structura ribozomilor 379

Structura ARNt 380

Sarcina ARNt 382

14.2 Traducerea ARNm poate fi împărțită în trei 383 de trepte

Inițiere 383

Alungire 384

Terminarea 385

Poliribozomi 386

14.3 Studiile de înaltă rezoluție au dezvăluit multe detalii despre ribozomii procarioți funcționali 386

14.4 Traducerea este mai complexă la eucariote 388

14.5 Prima idee că proteinele sunt importante pentru ereditate a venit din studiul erorilor metabolice congenitale 389

Fenilcetonurie 390

14.6 Studiile efectuate pe *Neurospora* au condus la ipoteza unei gene - o enzimă 390

Analiza mutanților Neurospora Beadle și Tatum 390

Genele și enzimele: analiza căilor biochimice 392

14.7 Studiile asupra hemoglobinei umane au stabilit că o genă codifică un polipeptid 393

Anemia falciformă 393

Hemoglobine umane 395

14.8 Secvența de nucleotide a unei gene și secvența de aminoacizi a proteinei corespunzătoare prezintă coliniaritate 395

14.9 Variația structurii proteinelor oferă baza diversității biologice 396

14.10 Modificările post-translaționale alterează produsul proteic final 400

Plierea proteinelor și erorile de pliere 400

14.11 Proteinele funcționează adoptând roluri foarte diverse 401

14.12 Proteinele sunt alcătuite din unul sau mai multe domenii funcționale 402

Amestecarea exonilor 403

Originea domeniilor proteice 404

■ EXPLORAREA GENOMICII

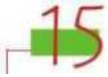
Instrumente de traducere și Swiss-Prot pentru studiul secvențelor proteice 404

STUDIU DE CAZ *Pierdut în traducere* 406

Puncte de rezumat 406

Idei și soluții 406

Probleme și întrebări pentru discuții 407



Mutația genetică, repararea ADN și transpoziție 410

15.1 Mutațiile sunt clasificate în diverse moduri 411

Mutații spontane și induse 411

Testul de fluctuație : Mutațiile sunt aleatorii sau adaptive? 412

Clasificare bazată pe localizarea mutației 413

Clasificare bazată pe tipul de modificare moleculară 414

Clasificare bazată pe efectele fenotipice 414

15.2 Mutațiile spontane apar din erori de replicare și modificarea bazelor 416

erori de replicare a ADN-ului *și* alunecări de teren 416

Modificări tautomerice 416

Depurinare *și* descurajare 417

Daune oxidative 418

Transpozoni 418

15.3 Mutațiile induse apar din cauza deteriorării ADN-ului cauzate de agenți chimici și radiații 419

Analogi de baze 419

alchilanți, intercalanți și formatori de aducti 420

Lumină ultravioletă 420

Radiații ionizante 421

15.4 Mutațiile unei singure gene cauzează o gamă largă de boli la oameni 422

Mutații cu o singură pereche de baze și / J-talasemie 423

Mutații cauzate de repetiții de ADN expandabile 423

15.5 Organismele folosesc sisteme de reparare a ADN-ului pentru a contracara mutațiile 425

Detectarea erorilor și repararea asocierilor incorecte 425

Repararea post-replicare și sistemul de reparare SOS 426

Repararea prin fotoreactivare : inversarea deteriorării UV 426

Repararea prin excizie a bazelor și nucleotidelor 427

Repararea prin excizie a nucleotidelor și bolile speciei umane 428

Repararea rupturilor dublu catenare la eucariote 429

15.6 Testul Ames este utilizat pentru a evalua mutagenitatea compușilor chimici 431

15.7 Geneticienii folosesc mutații pentru a identifica gene și a studia funcția genelor 432

Inducerea mutațiilor cu radiații, compuși chimici și inserarea de transpozoni 432

Screening-ul și selecția mutațiilor 432

15.8 Elementele transpozabile se mișcă în genom și pot crea mutații 433 Secvențe de inserție și transpozoni bacterieni 433 Sistemul *Ac-Ds* în porumb 434

copie și P din *Drosophila* 434 Elemente transpozabile la specia umană 436 Transpozoni, mutații și evoluție 436

■ EXPLORAREA GENOMICĂ Alinierea secvențelor pentru identificarea unei mutații 437

STUDIU DE CAZ Nanism genetic 439

Puncte de rezumat 439

Idei și soluții 440

Probleme și întrebări pentru discuții 440

Reglarea expresiei genelor la procariote 443

16.1 Procariotele reglează expresia genelor ca răspuns la condițiile de mediu 444

16.2 Metabolismul lactozei la *E. coli* este reglat de un sistem inductibil 445

Genele structurale 445

Descoperirea mutațiilor reglatoare 446 Modelul operonului: control negativ 447

Testarea genetică a modelului operon 449 Izolarea represorului 450

16.3 Proteina activatoare de catabolit (CAP) exercită un control pozitiv asupra operonului *lac* 450

16.4 Analiza structurii cristaline a complexelor represoare a confirmat modelul operonului 452.

16.5 Operonul triptofanului (frp) din *E. coli* este un sistem genetic represat 454

operonului *trp* 454

16.6 Atenuarea este un proces crucial în reglarea operonului *trp* în *E. coli* 456. Proteinele TRAP ***şi***

AT direcționează atenuarea în *B. subtilis* 456

16.7 Ribo-comutatorii utilizează ARN-ul senzor de metabolit pentru a regla expresia genelor 459

16.8 Operonul *ara* este controlat de o proteină reglatoare care exercită atât control pozitiv, cât și negativ 460

STUDIU DE CAZ Toxiinfecție alimentară și expresie genică bacteriană 461

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Simțul colectivității: rețele sociale în lumea bacteriilor 462

Puncte de rezumat 463

Idei *şi* soluții 463

Probleme și întrebări pentru discuții 464

17

Reglarea expresiei genelor la eucariote 468

17.1 Reglarea genelor la eucariote poate avea loc în oricare dintre etapele care duc de la ADN la produsele proteice 469

17.2 Rearanjamentele programate ale ADN-ului reglează expresia unui număr mic de gene 470

Sistemul imunitar și diversitatea anticorpilor 470 Rearanjamente *GENETICE* în gena k al lanțului ușor 471

173 Expresia genelor la organismele eucariote este influențată de modificări ale cromatinei 473

Teritorii cromozomiale și fabrici de transcripție 473 Modificări ale histonei și remodelarea cromatinei nucleozomale 473

Mediere ADN 474

17.4 Inițierea transcripției eucariote este reglată la anumite locuri de acțiune în *cis* 475

Elemente promoționale 475

Intensificatoare și amortizoare de zgomot 477

17.5 Inițierea transcripției eucariote este reglată de factori de transcripție care se leagă de situsurile de legare *cis* .

Gena HA a metalotioneinei umane: factori multipli de transcripție și elemente cis - acțiune 478

Domeniile funcționale ale factorilor de transcripție eucarioți 479

17.6 Activatorii și represorii interacționează cu factorii generali de transcripție la promotorul 480

Formarea complexului de inițiere a transcripției ARN polimerazei II 480

factorilor generali de transcripție cu activatori și represori 481

17.7 Reglarea genelor într-un organism model: transcripția genelor GAL de drojdie 482

17.8 Reglarea genelor post-transcripționale are loc în toate etapele, de la procesarea ARN-ului până la modificarea proteinelor 483

Splicing alternativ al ARNm 483

Tăiere și îmbinare alternativă și boli umane 485

Determinarea sexului la Drosophila ; un model alternativ de reglare a splicingului 485

Controlul stabilității ARNm 487

Reglementare translațională și post-translațională 487

17.9 Silențierea ARN controlează expresia genelor în mai multe moduri 488

Mecanisme moleculare ale silențierii genelor induse de ARN 488

Reducerea la tăcere a genelor indusă de ARN în biotehnologie și medicină 489

■ EXPLORAREA GENOMICII

Expresia genelor specifice țesuturilor 491 STUDIU DE CAZ O distrofie musculară misterioasă 492

Puncte de rezumat 492

Idei și soluții 493

Probleme și întrebări pentru discuții 494

4®

Genetică a Dezvoltării 497

18.1 Stările diferențiate se dezvoltă din programe coordonate de expresie genică 498

18.2 Conservarea evolutivă a mecanismelor de dezvoltare poate fi studiată folosind organisme model 499
Analiza mecanismelor de dezvoltare 499

18.3 Analiza genetică a dezvoltării embrionare a *Drosophilei* dezvăluie modul în care este specificată axa corpului animalului 499
Aspecte generale ale dezvoltării *Drosophilei* 499 Analiza genetică a embriogenezei 500

18.4 Genele zigotice programează formarea segmentelor în *Drosophila* 502
Decalaj genetic 503
503 gene de perechi de reguli
Genele de polaritate ale segmentului 503
Genele de segmentare la șoareci *și* ființe umane 504

18.5 Genele selectoare homeotice specifică părțile corpului adult 504
Genele *Hox* în *Drosophila* 505
Genele *Hox și* tulburările genetice umane 507

18.6 Plantele au dezvoltat sisteme de dezvoltare paralele cu cele ale animalelor 508
Genele homeotice la *Arabidopsts* 509 Divergența evolutivă a genelor homeotice 510

18.7 Interacțiunile celulare în timpul dezvoltării sunt modelate în C. *elegans* 511

Trasee de semnalizare în curs de dezvoltare 511
Ruta de semnalizare Notch 511
Generalități ale dezvoltării lui C *elegans* 512
Analiza genetică a formării vulvei 513

18.8 Moartea celulară programată este necesară pentru dezvoltarea normală 514

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE
Războiul celulelor stem 515

STUDIU DE CAZ Unul și celălalt picior 517

Puncte de rezumat 517
Idei și soluții 517
Probleme și întrebări pentru discuții 518

19

Cancerul și reglarea ciclului celular 521

19.1 Cancerul este o boală genetică la nivelul celulelor somatice 522
Ce este cancerul ? 522
Originea clonală a celulelor canceroase 523 Ipoteza celulelor stem canceroase 523 Cancerul este un proces în mai multe etape care necesită mutații multiple 524

19.2 Celulele canceroase conțin defecte genetice care afectează stabilitatea genomică, repararea ADN-ului și modificările cromatinei. 525
Instabilitate genomică și reparare defectuoasă a ADN-ului 525
Modificări ale cromatinei și epigenetică în cancer 526

19.3 Celulele canceroase conțin defecte genetice care afectează reglarea ciclului celular 527
Ciclul celular și transducția semnalului 527 Controlul ciclului celular și punctele de control 528 Controlul apoptozei 529

19.4 Proto-oncogenele și genele supresoare tumorale sunt alterate în celulele canceroase 529
Proto -oncogenele ras 531
Gena supresoare tumorală *p53* 53 1
Gena supresoare tumorală RB1 533

19.5 Celulele canceroase metastazează și invadează alte țesuturi 534

19.6 Predispoziția la unele tipuri de cancer poate fi ereditară 535

19.7 Virușii contribuie la apariția cancerului atât la oameni, cât și la animale 536

19.8 Agenții de mediu contribuie la apariția cancerelor umane 538

■ EXPLORAREA GENOMICII
Proiectul de Anatomie a Genomului Cancerului (CGAP) 539

STUDIU DE CAZ Am crezut că este sigur 539

Puncte de rezumat 540

Idei și soluții 540

Probleme și întrebări pentru discuții 541

CAPITOLUL SPECIAL DESPRE GENETICA MODERNĂ I
Analiza genomului personal 566
Genetică Forensică 544
Provocări tehnice, sociale și etice 568

Metode de obținere a profilurilor ADN 545
Amprentă genetică bazată pe VNTR 545
Profilarea ADN-ului folosind regiuni STR autozomale 546
Profilul STR al cromozomului Y 548
Profilul ADN-ului mitocondrial 549
550 de profiluri de polimorfism cu un singur nucleotid

Interpretarea profilurilor ADN 552
Unicitatea profilurilor ADN 553
Eroarea procurorului 553
Baze de date cu profiluri ADN 553

Probleme tehnice și etice legate de profilurile ADN 554

Lecturi și resurse selectate 555

CUPLET SPECIAL DESPRE GENETICA MODERNĂ II
Genomică și medicină personalizată 556

Medicină personalizată și farmacogenomică 557
Optimizarea terapiilor farmacologice 557
Reducerea reacțiilor adverse la medicamente 560

Medicină personalizată și diagnosticul bolilor 563
-JAI^LO SPECIAL DESPRE GENETICĂ MODERNĂ III
Epigenetică 570

Alterări epigenetice ale genomului 572
Metilarea 572
Modificarea histonei 573
Interferență ARN 574

Epigenetică și imprimare 575

Epigenetică și cancer 577

Epigenetică și comportament 579

Epigenetică și mediu 581

Proiecte Epigenom 582

Lecturi și resurse selectate 582

CAPELLO SPECIAL DESPRE GENETICĂ MODERNĂ IV
Celule stem 583

Ce sunt celulele stem? 584
Surse și tipuri de celule stem 584
Stimularea CME pentru diferențierea 586
Celule stem adulte (ASC) 586

Lecturi și resurse selectate 569

Celule stem din lichidul amniotic 587
Celule stem canceroase 587

Teste pentru determinarea pluripotenței 587 Tehnici de reprogramare nucleară pentru producerea de celule stem pluripotente 589

Celule stem pluripotente induse 589

Celule stem pluripotente induse de ARN 592 Aplicații potențiale ale celulelor stem 592

Celule iPSC pentru tratamentul anemiei falciforme 595
Clonare terapeutică 596

Probleme și provocări legate de celulele stem care vor trebui rezolvate 597

Reglementări legale privind celulele stem 597

Probleme etice legate de celulele stem 599

Lecturi și resurse selectate 600

TRIMESTRU

Genomică

Maparea restricțiilor 617

20

Tehnologia ADN-ului recombinant 601

20.1 Tehnologia ADN-ului recombinant a început cu două instrumente fundamentale: enzimele de restricție și vectorii de clonare a ADN-ului. 602

Enzimele de restricție taie ADN- ul la secvențe specifice de recunoaștere 602

Vectorii ADN acceptă și replică moleculele de ADN pe care dorim să le clonăm 603

Vectori plasmidici bacterieni 604

Alte tipuri de vectori de clonare 607 Vectori Ti pentru celule vegetale 607

Celule gazdă pentru vectori de clonare 608

20.2 Bibliotecile de ADN sunt colecții de secvențe clonate 609

Biblioteci de gene genomice 609

ADN complementar (ADNc) 609 Este posibilă recuperarea unor gene specifice dintr -o bibliotecă prin screening 611

20.3 Reacția în lanț a polimerazei este o tehnică puternică pentru copierea ADN-ului 613 Limitări ale PCR 615

Aplicații ale PCR 615

20.4 Tehnici moleculare pentru analiza ADN-ului 617

20.5 Secvențierea ADN-ului este modalitatea definitivă de a caracteriza structura ADN-ului la nivel molecular 621

Tehnologiile de secvențiere au progresat rapid 624

Tehnologii de secvențiere de generație următoare 624

Secvențierea ADN-ului și genomică 626

Hibridizarea acidului nucleic 618

EXPLORÂND GENOMICA

Manipularea ADN-ului recombinant : cartografiere de restricție și design de primeri PCR 627

STUDIU DE CAZ Ar trebui să ne preocupe tehnologia ADN-ului recombinant? 629

Puncte de rezumat 629

Idei și soluții 630

Probleme și întrebări pentru discuții 630

21

Genomică, bioinformatică și proteomică 634

21.1 Secvențierea fragmentelor aleatorii este o metodă utilizată pe scară largă pentru secvențierea și asamblarea genomurilor întregi 636

Secvențierea cu randament ridicat și impactul acesteia asupra genomicii 638

Tehnica de la clonă la clonă 638

Schițe de secvență și verificare a erorilor 640

21.2 Analiza secvenței ADN se bazează pe aplicații bioinformatice și baze de date genomice 641

Adnotare pentru identificarea secvențelor genetice 641

Caracteristicile distinctive ale unei secvențe genetice pot fi recunoscute în timpul adnotării 643

213 Genomica funcțională urmărește să identifice funcțiile potențiale ale genelor și ale altor elemente ale unui genom 645 Predicția funcțiilor genelor și proteinelor prin analiza secvențelor 646

Predicția funcției din analiza structurală a motivelor și domeniilor proteice 647

Cercetătorii utilizează tehnici genomice precum imunoprecipitarea cromatinei pentru a investiga aspecte ale funcției și reglării genomice. 647

21.4 Proiectul **Genomului Uman a dezvăluit multe aspecte importante ale organizării genomului la specia umană 648** Originile proiectului 649

Principalele caracteristici ale genomului uman 649

21.5 Revoluția „omică" a dat naștere unei noi ere în cercetarea biologică 652 Genomică din epoca de piatră 654

La 10 ani de la proiectul HGP: care sunt următorii pași? 655

Proiecte de genom personalizat și genomică personală 655

Proiectul Microbiomului Uman 657

Fără genom nesecvențiat și proiectul Genome 10K 657

21.6 Genomica comparativă analizează și compară genomurile diferitelor organisme. 658 de genomuri procariote și eucariote prezintă

caracteristici structurale comune, împreună cu diferențe importante 658

Genomica comparativă oferă informații noi despre genomurile organismelor model și despre genomul uman 660

Genomul câinelui 660

Genomul cimpanzeului 661

Genomul macacului rhesus 662

Genomul ariciului de mare 662

Genomul neanderthalian și oamenii moderni 663

Genomica comparativă este utilă pentru studierea evoluției și funcției familiilor multigenice 664

21.7 Metagenomica aplică tehnici genomice probelor prelevate din mediu 666

21.8 Analiza transcriptomului dezvăluie profilurile genelor exprimate în celule și țesuturi 668

21.9 Proteomica identifică și analizează compoziția proteică a celulelor 672

Reconcilierea dintre numărul de gene și numărul de proteine exprimate de o celulă sau un țesut 673

Tehnologii proteomice : electroforeză bidimensională în gel pentru separarea proteinelor 673

Tehnologii proteomice: spectrometrie de masă pentru identificarea proteinelor 675

Identificarea colagenului în fosilele de Tyrannosaurus *rex* și *Mammut americanum* 677

21.10 Biologia sistemelor este o abordare integrată a studiului interacțiunilor tuturor componentelor celulelor unui organism. 680

STUDIU DE CAZ Bioprospectarea pe urmele lui Darwin 682

■ EXPLORAREA GENOMICII

Cóntigos, secvențiere prin fragmente selectate aleatoriu și genomică comparativă 683

Puncte de rezumat 684

Idei și soluții 685

Probleme și întrebări pentru discuții 686

Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei 688

22.1 Organismele modificate genetic sintetizează o gamă largă de produse biologice și farmaceutice 689

Producția de insulină de către bacterii 690

Gazde animale transgenice și produse farmaceutice 691

Tehnici de ADN recombinant pentru producerea de vaccinuri și plante transgenice cu vaccinuri comestibile 692

22.2 Ingineria genetică a plantelor a îmbunătățit agricultura 694

Plante transgenice cu rezistență la dăunători și erbicide 696

Îmbunătățirea nutrițională a plantelor de cultură 697

22.3 Animalele transgenice cu caracteristici îmbunătățite genetic pot juca un rol important în domeniul biotehnologiei 698
Obținerea unui animal transgenic: elemente fundamentale 698
Exemple de animale transgenice 699

22.4 Genomuri sintetice, transplant de genom și nașterea biologiei sintetice 701
Un genom sintetic și un transplant genomic permit crearea unei tulpini bacteriene 702

22.5 Ingineria genetică și genomica transformă diagnosticul medical. 704 Teste genetice bazate pe analiza enzimatică a restricție 705
Teste genetice utilizând oligonucleotide specifice alelei 706
Testare genetică folosind cipuri ADN și trasare genomică 709
Analiza genetică utilizând cipuri de expresie genică 712
Aplicarea cipurilor ADN pentru analiza genotipică și exprimarea genelor agenților patogeni 714

22.6 Studiile de asociere la nivelul întregului genom permit identificarea variațiilor genomice care contribuie la apariția bolilor 715

22.7 Genomica permite tratamente medicale noi, mai bine direcționate, inclusiv medicina personalizată și terapia genică 718 Farmacogenomică și proiectarea rațională a medicamentelor 718 Terapia genică 720

22.8 Ingineria genetică, genomica și biotehnologia ridică întrebări etice, sociale și juridice. 724
Preocupări legate de organismele și alimentele modificate genetic 724

Testarea genetică și dilemele etice 725
Testarea genetică direct către consumator și reglementarea companiilor care furnizează servicii de testare genetică 726
Probleme etice legate de terapia genică 727
Brevete ADN și gene 727
biologie sintetică 729

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Proiecte genomice personale și cursa pentru obținerea unui genom pentru 1.000 USD 728

STUDIU DE CAZ Terapia genică de pionierat 729 Puncte de rezumat 729

Idei și soluții 730

Probleme și întrebări pentru discuții 731

PARTEA A CINCEA

Genetica organismelor și a populațiilor

23

Genetică cantitativă și trăsături multifactoriale 734

23.1 Nu toate trăsăturile poligenice prezintă variație continuă 735

23.2 Caracteristicile cantitative pot fi explicate în termeni mendelieni 736
Ipoteza genelor multiple pentru moștenirea cantitativă 736
Alele aditive: baza variației continue 737
Calculul numărului de poligene 737

23.3 Studiul trăsăturilor poligenice depinde de analiza statistică 738
Media 739
Varianța 739
Abaterea standard 739
Eroarea standard a mediei 740 Covarianță 740
Analiza unui caracter cantitativ 740

23.4 Valorile de ereditabilitate estimează contribuția genetică la variabilitatea fenotipică 741
Eritabilitate în sens larg 743
Ereditate în sens strict 743
Selecție artificială 744

23.5 Studiile pe gemeni ne permit să estimăm ereditabilitatea la specia umană 745

Studiile pe gemeni au unele limitări 746

23.6 Locii trăsăturilor cantitative sunt utili în studiul fenotipurilor multifactoriale 747

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Din nou revoluția verde: cercetare genetică cu orez 750

STUDIU DE CAZ O surpriză genetică 751

Puncte de rezumat 752

Idei și soluții 752

Probleme și întrebări pentru discuții 753

24

Genetica comportamentală 757

24.1 Abordarea analizei comportamentale poate stabili tulpini genetice cu diferențe de comportament 759

Cartografierea genelor legate de anxietate la șoareci 759

Selecția geotaxiei la *Drosophila* 760

24.2 Abordarea analizei genă cu genă examinează alelele mutante pentru a studia mecanismele care stau la baza comportamentului 762

Genele implicate în transmiterea impulsurilor nervoase 763

Drosophila poate învăța și ține minte 764

Disecția mecanismelor și căilor neuronale ale învățării 764

24.3 Comportamentul uman are componente genetice 766

Gene izolate și comportament: boala Huntington 766

Un model transgenic de șoarece pentru boala Huntington 767

Mecanismele bolii Huntington 767 Caracteristici comportamentale complexe : schizofrenia 768 Schizofrenia și autismul sunt tulburări înrudite ale neurodezvoltării 770

■ EXPLORAREA GENOMICII HomoloGene: în căutarea genelor comportamentale 771

STUDIU DE CAZ Modele de primate pentru studiul tulburărilor umane 772

Puncte de rezumat 772

Idei și soluții 772

Probleme și întrebări pentru discuții 773

25

Genetica populațiilor și genetica evolutivă 776

25.1 Variația genetică este prezentă în majoritatea populațiilor și speciilor 777

Detectarea variației genetice prin selecție artificială 777

Variații ale secvenței nucleotidice 778

Explicația nivelului ridicat de variație genetică în populații 779

25.2 Legea Hardy-Weinberg descrie frecvențele alelelor și frecvențele genotipurilor populațiilor 780

25.3 Legea Hardy-Weinberg poate fi aplicată populațiilor umane 782

Calculul frecvenței alelelor 782

Verificarea echilibrului Hardy-Weinberg 784

Calculul frecvențelor pentru alele multiple în populațiile Hardy-Weinberg 784

Calculul frecvențelor alele pentru trăsăturile legate de X 785

Calculul frecvenței heterozigoților 786

25.4 Selecția naturală este una dintre principalele forțe care modifică frecvența alelelor 786

Detectarea selecției naturale în cadrul populațiilor 787

Aptitudine biologică și selecție 787

Există mai multe tipuri de selecție 788

25.5 Mutația creează noi alele în cadrul unui fond genetic 790

25.6 Migrația și fluxul genetic pot modifica frecvențele alelelor 791

25.7 Deriva genetică provoacă modificări aleatorii ale frecvențelor alelelor în populații mici 791

Efectele fondatorului în populațiile umane 791

25.8 Potrivirea non-aleatorie modifică frecvența fenotipică, dar nu și frecvența alelelor 793

Consangvinizare 793

25.9 Fluxul genetic redus, selecția și deriva genetică pot duce la speciație 794

Schimbări care duc la speciație 796 Rata macroevoluției și speciației 796

25.10 Filogenia poate fi utilizată pentru a analiza istoria evoluției 797

Construcția arborilor filogenetici din secvențe de aminoacizi 798

Ceasurile moleculare măsoară viteza schimbării evolutive 798

Analiza divergenței genetice dintre neanderthalieni și oamenii moderni 799

Proiectul Genomului Neanderthal 800

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Urmărind amprentele noastre genetice în afara Africii 802

STUDIU DE CAZ Un rezultat neașteptat 803 Puncte de rezumat 804

Idei și soluții 804

Probleme și întrebări pentru discuții 805

26

Genetica conservării 808

26.1 Diversitatea genetică este scopul geneticii conservării 810 Pierderea diversității genetice 81 1

Identificarea diversității genetice 812

26.2 Mărimea populației are un impact important asupra supraviețuirii speciilor 813

26.3 Efectele genetice sunt mai pronunțate în populațiile mici, izolate 814

Deriva genetică 815

Consangvinizare 815

Reducerea fluxului genetic 817

26.4 Eroziunea genetică amenință supraviețuirea speciilor 818

26.5 Conservarea diversității genetice este esențială pentru supraviețuirea speciilor 819

Conservare *ex situ :* reproducere în captivitate 819

Creșterea în captivitate: dihorul cu picioare negre 820

Conservare *ex situ* și bănci de gene 821

Conservare *in situ* 822

Creșterea populației 822

■ GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE Bazine genetice și specii amenințate: situația critică a pumei din Florida 823

STUDIU DE CAZ Cealaltă față a Revoluției Verzi 824

Puncte de rezumat 825

Idei și soluții 825

Probleme și întrebări pentru discuții 826

Anexa A Lecturi selectate 828

Anexa B Răspunsuri 840

Glosar 892

Credite 918

indice analitic 925

Prefaţă

Este esențial ca autorii de manuale să privească în urmă și să își examineze munca cu ochi proaspeți atunci când planifică fiecare nouă ediție . Procedând astfel, ar trebui să ia în considerare două întrebări principale: (1) cum a crescut și a evoluat corpul principal de informații din domeniul lor - în acest caz, Genetica - de la ultima ediție; și (2) ce inovații pedagogice pot fi dezvoltate și încorporate în text care vor îmbunătăți, fără îndoială, procesul de învățare al studenților . Pregătirea celei de-a zecea ediții a cărții *Concepte în Genetică,* aflată acum în al treilea deceniu de sprijinire a studenților acestei discipline, ne-a oferit oportunitatea pentru o altă revizuire. În această nouă ediție, pe lângă actualizările obișnuite necesare, ne-am concentrat pe două lucruri: (1) necesitatea de a crește oportunitățile pentru instructori și studenți de a se implica în tehnici de învățare activă și cooperativă , atât în interiorul, cât și în afara sălii de clasă; și (2) necesitatea de a oferi o acoperire cuprinzătoare a subiectelor emergente importante care nu merită încă un capitol tradițional - propriu .

În ceea ce privește primul punct, așa cum este detaliat mai jos , am adăugat o nouă caracteristică pedagogică numită Studiu de caz, care apare la sfârșitul fiecărui capitol. În plus, am transformat secțiunile Genetică, Tehnologie și Societate de la sfârșitul multor capitole în secțiuni de învățare activă, adăugând o secțiune numită Rândul tău . Aceste caracteristici completează secțiunile noastre distinctive Explorarea genomicii și pot funcționa împreună pentru a forma o bază pentru interacțiunea între grupuri mici de studenți, atât în interiorul , cât și în afara sălii de clasă. În ceea ce privește al doilea punct, referitor la tratarea problemelor emergente, am dezvoltat o abordare originală în cadrul cărților de Genetică, oferind cititorilor un set de patru capitole prescurtate, extrem de specializate, numite Capitole speciale despre genetică modernă . Așa cum este descris mai jos, aceste capitole speciale oferă o acoperire originală și cuprinzătoare a patru subiecte importante: *Știința criminalistică, Genomica și medicina personalizată, Epigenetica și* și *celule stem.*

Evident, domeniul geneticii a crescut enorm de la prima publicare a acestei cărți, atât în ceea ce privește ceea ce știm, cât și ceea ce dorim ca noii studenți să învețe . Prin producerea acestei ediții, am căutat nu doar să continuăm să familiarizăm studenții cu cele mai importante descoperiri din ultimii 150 de ani, ci și să -i ajutăm să conecteze aceste informații cu mecanismele genetice - subiacente care explică procesele celulare, diversitatea biologică și evoluția . În plus , am subliniat și conexiunile dintre genetica moștenirii , genetica moleculară, genomica și proteomica și genetica evolutivă a populațiilor .

Pe măsură ce intrăm în al doilea deceniu al acestui mileniu, descoperirile în genetică continuă să fie numeroase și profunde. Pentru studenții la genetică, entuziasmul participării la această inițiativă trebuie să fie echilibrat de un puternic simț al responsabilității și de o atenție deosebită acordată numeroaselor probleme științifice, sociale și etice care au apărut deja , precum și celor care vor apărea , fără îndoială , în viitor. Factorii de decizie politică , legislatorii și un public din ce în ce mai informat vor solicita cunoștințe din ce în ce mai detaliate despre genetică pentru a aborda aceste probleme . Prin urmare, nevoia unui manual de genetică care să explice clar principiile acestei discipline nu a fost niciodată mai mare .

Obiective

În a zecea ediție a cărții *„Concepte de genetică”,* ca și în toate - edițiile anterioare , avem cinci obiective principale . Mai exact, am încercat să:

- Subliniați conceptele de bază ale geneticii .
- Scrieți clar și direct pentru studenți , pentru a oferi explicații ușor de înțeles ale unor subiecte analitice complexe .
- Mențineți un accent constant pe rezolvarea problemelor și oferiți multiple tehnici pentru abordarea acestora.
- Pentru a propaga bogata istorie a geneticii , care ilustrează atât de frumos modul în care informațiile sunt dobândite în timpul cercetării științifice .
- color atractive, plăcute și utile din punct de vedere pedagogic , completate de fotografii la fel de utile , pentru a sprijini dezvoltarea conceptelor .

Setul acestor obiective servește drept piatra de temelie a cărții *Concepte de genetică.* Aceste concepte pedagogice permit utilizarea cărții în cursuri cu multe abordări și formate de lectură diferite. Deși capitolele sunt prezentate într-o ordine coerentă care reprezintă o posibilă abordare pentru un curs de genetică , capitolele

Aceste obiective au fost formulate astfel încât să fie cât mai independente posibil, permițând instructorilor să le utilizeze în ordine diferite. Credem că abordările variate integrate în aceste obiective oferă studenților un sprijin optim pentru studiul geneticii.

Scrierea unui manual care atinge aceste obiective și oportunitatea de a-l îmbunătăți continuu cu fiecare nouă ediție a fost o inițiativă plină de satisfacții pentru noi. Crearea fiecăreia dintre cele zece ediții reflectă nu doar pasiunea noastră pentru predarea geneticii, ci și feedback-ul constructiv și sprijinul oferit de profesori, recenzori și studenții noștri în ultimele trei decenii.

Noi caracteristici ale acestei ediții

- Capitole speciale despre genetica modernă. Pe măsură ce noi domenii de cercetare în genetică prind contur și evoluează, acestea își găsesc treptat locul în manuale, fie ca secțiuni scurte într-un capitol (când sunt foarte specifice), fie ca mențiuni scurte în mai multe capitole (când sunt mai generale). Unele dintre aceste subiecte pot fi de mare interes, având o bază genetică; altele reprezintă aplicații importante ale cunoștințelor genetice; altele sunt secundare în ceea ce privește acoperirea posibilă într-o carte introductivă. În toate cazurile, aceste subiecte sunt dificil de localizat pentru studenți și instructori printre toate celelalte materiale și uneori sunt abia acoperite. Acest lucru ne provoacă nouă, ca autori, o frustrare considerabilă.

  În această ediție, există o nouă caracteristică care sperăm că va depăși aceste limitări - crearea unei serii de capitole mai scurte și mai specializate, pe care le-am numit Capitole Speciale de - Genetică Modernă. Le -am făcut loc în cadrul textului, oferind o acoperire concisă și coerentă, care se concentrează pe conținutul esențial și elimină alte caracteristici găsite în capitolele tradiționale. Pe scurt, scopul nostru este de a oferi o acoperire concisă atât pentru dezvoltarea unei prelegeri pe fiecare temă, cât și pentru a sprijini studenții care ar fi putut participa la o prelegere pe oricare dintre aceste teme speciale. Și în cazul în care subiectele nu sunt acoperite într-un curs, suntem convinși că acestea sunt de un interes general suficient încât studenții vor dori să le citească singuri. Pentru această ediție, am selectat patru subiecte importante care constituie completări originale valoroase la text, oferind o acoperire aprofundată și actualizată care altfel nu ar fi posibilă:

  1. Știința criminalistică
  2. Genomică și medicină personalizată
  3. Epigenetică
  4. Celule stem

  Figurile interesante care însoțesc fiecare capitol special sunt disponibile în PowerPoint pentru o utilizare ușoară în prezentările din sala de clasă . Capitolele speciale sunt scrise pentru a fi independente, astfel încât pot fi atribuite și ca proiecte ale studenților fără a fi nevoie de un curs sau o lecție dedicată . Credem că aceste capitole speciale prezintă materiale importante pentru înțelegerea geneticii moderne și merită un tratament specific în capitole scurte și independente . Deși am introdus capitolele speciale după Capitolul 19, acestea pot fi utilizate oricând în timpul cursului sau în timpul citirii cărții , ori de câte ori instructorul consideră necesar . Sperăm că toți utilizatorii acestui text vor găsi aceste capitole adăugate un supliment extrem de practic la cursul lor de genetică .
- Studiu de caz. După cum se explică mai jos, fiecare capitol include acum un studiu de caz , care pune mai multe întrebări pentru discuții . Această caracteristică face parte din efortul nostru de a oferi oportunități ample pentru învățare activă și colaborativă .

Subiecte actualizate

Deși am actualizat fiecare capitol al textului pentru a prezenta cele mai recente descoperiri din domeniul geneticii , mai jos enumerăm câteva dintre cele mai importante și specifice subiecte care au atras atenția .

Capitolul 1. Introducere în genetică
- Nouă secțiune istorică despre începuturile geneticii .
- A fost adăugată o secțiune despre Charles Darwin și evoluție .
- Explicația conceptelor genetice a fost simplificată .

Capitolul 2. Mitoză și meioză
- Coperta a fost reînnoită și a fost adăugată o figură referitoare la rolul cohesinei și shugoșinei în timpul mitozei și meiozei .

Capitolul 3. Genetica mendeliană
- Nou tratament al bazei moleculare a bolii Tay - Sachs .

Capitolul 4. Extensii ale geneticii mendeliene
- Figură revizuită care prezintă baza biochimică a grupelor sanguine ABO .
- Nou tratament al bazei moleculare a

dominanței și recesivității, ilustrat de gena *agouti* la șoareci.

Capitolul 5. Cartografierea cromozomilor la eucariote

- Tratament simplificat al cartografiei haploide.

Capitolul 6. Analiza și cartografierea genetică la bacterii și bacteriofagi

- Recapitularea expunerii și terminologiei referitoare la transducție.
- Figuri referitoare la conjugarea refăcută. Capitolul 7.

Determinarea sexului și cromozomii sexuali

- Tratament actualizat al determinării sexului la mamifere.
- Tratament actualizat al cromozomului Y uman.
- Tratament actualizat al mecanismului de inactivare a cromozomului X.
- Informații noi referitoare la determinarea sexului la găini, incluse sub forma a două noi probleme extra-picante.

Capitolul 8. Mutații cromozomiale: variația numărului și aranjamentului cromozomilor

- Tratament suplimentar al regiunii critice (DSCR) a sindromului Down.
- Prezentarea diagnosticului prenatal neinvaziv (N1PGD).
- Nou tratament al genei TERT (telomerază reverstranscriptază) și relația acesteia cu sindromul cricat .
- Noi expuneri privind variațiile numărului de copii (CNV) la nivel molecular.

Capitolul 9. Moștenirea extranucleară

- Secțiune nouă despre mitocondrii, sănătatea umană și îmbătrânire.

Capitolul 10. Structura și analiza ADN-ului

- A extins tratamentul clasic al analizei structurii ADN-ului.

Capitolul II. Replicarea și recombinarea ADN-ului

- Tratamentul cu telomerază a fost actualizat.
- Tratament actualizat al replicării ADN-ului eucariot, precum și al factorilor de asamblare a cromatinei (CAF).

Capitolul 12. Organizarea ADN-ului în cromozomi

- Introducere în rolul remodelării cromatinei în modificările epigenetice.
- Secțiune nouă despre secvențele de ADN telomeric și TERRA (ARN telomeric care conține repetiții).
- Noi fotografii ale cromozomilor și nucleozomilor polienici.

Capitolul 13. Codul genetic și transcripția

- Figură nouă și tratament actualizat care arată acțiunea ARN polimerazei în timpul transcripției procariote.
- Tratament actualizat al transcripției la eucariote

Capitolul 14. Traducere și proteine

- Nou tratament al rolului dinamic al ribozomului eucariot în timpul traducerii.
- O introducere în aminoacizii selenocisteină (Sec) și pirolizină (Pyl), care se găsesc în archaea , bacterii și eucariote.

Capitolul 15. Mutația genetică, repararea și transpoziția ADN-ului

- Secțiune nouă - Mutațiile genetice unice cauzează o gamă largă de boli la om - care descrie tipurile de tulburări umane cauzate de diferitele clase de mutații genetice unice descrise în capitol.
- Beta-talasemia este prezentată ca exemplu de tulburare non-umană prevalentă care poate fi cauzată de multe tipuri diferite de mutații într-o singură genă.
- Material nou care descrie legătura dintre repararea defectuoasă a perechilor nepotrivite și cancere precum leucemiile, limfoamele și tumorile ovarelor, prostatei și endometrului.
- Nouă secțiune despre elementele transpozabile, inclusiv o nouă subsecțiune despre transpozoni, mutații și evoluție.

Capitolul 16. Reglarea expresiei genelor la procariote

- Figură nouă și expunere revizuită a atenuării în operonul triptofan.
- Un nou tratament, inclusiv o nouă figură de ribocomutatori, ca molecule de ARN care detectează metaboliții.

Capitolul 17. Reglarea expresiei genelor la eucariote

- Actualizări privind remodelarea cromatinei , reglarea post-transcripțională , reglarea stabilității ARNm, controlul translației și reducerea la tăcere a ARN-ului.
- Secțiune nouă - Rearanjamentele programate ale ADN-ului reglează expresia unui număr mic de gene - unde sunt prezentate rearanjamentele genelor imunoglobulinelor.
- Materiale noi și actualizate despre promotorii de bază, promotorii concentrați și dispersați și elementele promotoare.

Capitolul 18. Genetica dezvoltării

- Secțiuni combinate despre conservarea evolutivă a mecanismelor de dezvoltare și a organismelor model.
- Secțiunile privind determinarea și diferențierea la *Drosophila au fost consolidate.*
- Secțiune nouă despre moartea celulară programată.

Capitolul 19. Cancerul și reglarea ciclului celular

- Noi informații despre modificările cromatinei și epigenetica cancerului.
- Extinderea secțiunii despre metastaze și clarificarea - procesului de invazie.
- ipoteza celulelor stem canceroase .

Capitolul 20. Tehnologia ADN-ului recombinant

- Revizuire aprofundată și reorganizare a materialului dedicat tehnicilor de ADN recombinant.
- Accentul pus pe celulele gazdă a fost eliminat și a fost adăugat un rezumat de bază al diferiților vectori și al aplicațiilor acestora.
- Accent mai mare pus pe bibliotecile de gene.
- Accentul pus pe tehnicile de marcare radioactivă a fost modificat pentru a reflecta utilizarea actuală, mai răspândită, a metodelor de marcare și detectare non-radioactive (de exemplu, marcarea cu sonde, secvențierea).
- Adăugarea tehnicilor RT-PCR și PCR cantitativ în timp real (qPCR), inclusiv o nouă figură.
- Materiale noi despre FISH și cariotipare spectrală .
- O analiză amănunțită a materialului privind tehnologiile de secvențiere a ADN-ului, inclusiv secvențierea automată bazată pe electroforeză capilară și tehnologiile de secvențiere de ultimă generație, inclusiv o nouă figură.
- O analiză amănunțită a materialelor legate de PDQ și a unor probleme noi suplimentare.

Capitolul 21. Genomică , bioinformatică și proteomică

- Nouă secțiune despre „10 ani după Proiectul Genomului Uman", inclusiv o nouă secțiune despre Proiectul Microbiomului Uman.
- Conținut actualizat despre genomul uman, inclusiv informații noi despre variațiile numărului de copii (CNV).
- Conținut extins despre genomica „ epocii de piatră" și date noi despre genomul neanderthalian.
- Conținut extins despre genomică comparativă, pentru a include comparații între genomurile organismelor model și genomul uman.
- Nouă secțiune despre genomurile personale, inclusiv o nouă cifră privind costurile de secvențiere a genomului , progresul eforturilor de secvențiere și secvențierea genomurilor diploide individuale.
- Secțiune nouă despre proiectul Genome 10K.
- Conținut actualizat despre biologia sistemelor, inclusiv o nouă figură care compară rețelele de interacțiune genică ale bolilor umane.

Capitolul 22. Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei

- Explicații actualizate privind genomurile sintetice, testarea genetică direct către consumator (DTC) și brevetele pentru informații genetice.

Capitolul 24. Genetica comportamentală

- comportamentale și de analiză genetică pentru studiul comportamentului .
- Un accent mai mare pus pe sistemul nervos atunci când se analizează genetica comportamentală .
- Tratament revizuit și actualizat al geneticii comportamentului uman.
- Explicația legăturii dintre autism și schizofrenie .
- Noi tratamente ale tehnicilor genomice în domeniul geneticii comportamentale .

Capitolul 25. Genetica populațiilor și genetica evolutivă

- Un nou tratament integrat al geneticii populațiilor și evoluției , care sunt acum combinate într-un singur capitol.
- Nou tratament al legăturii dintre factorii care afectează frecvența alelelor și evoluție .
- Nouă secțiune despre filogenie și aplicarea acesteia la studiul evoluției .
- S-au adăugat materiale despre genomica comparativă a neanderthalienilor și a oamenilor moderni.

Capitolul 26. Genetica conservării

- speciilor pe cale de dispariție .

Această listă reflectă creșterea rapidă a informațiilor disponibile în domeniul geneticii.

Accent pe concepte

Titlul acestui manual — *Concepte de genetică* — a fost ales în mod deliberat pentru a reflecta abordarea noastră pedagogică de bază asupra predării geneticii. Cu toate acestea, cuvântul „concept" nu este atât de ușor

de definit pe cât ar putea părea. Simplu spus, considerăm un concept ca fiind o unitate cognitivă de sens — o reprezentare abstractă care cuprinde un set corelat de descoperiri și idei bazate științific. Astfel, un concept oferă o imagine mentală amplă care, de exemplu, ar putea reflecta o viziune simplificată asupra a ceea ce constituie un cromozom, o viziune dinamică asupra proceselor detaliate de replicare, transcriere și traducere a informațiilor genetice sau pur și simplu o percepție abstractă a modurilor de moștenire.

Credem că crearea acestor imagini mentale este cea mai bună modalitate de a preda discipline științifice, în acest caz, genetica . Detaliile care ar putea fi memorate, dar sunt uitate rapid , sunt integrate într-un cadru conceptual ușor de reținut. Conținutul acestui cadru poate fi extins pe măsură ce sunt dobândite informații noi și corelate cu alte concepte, oferind un mecanism util pentru integrarea și o mai bună înțelegere a unei game de procese și idei conexe. În acest fel, se poate dezvolta și transmite un set larg de concepte care, în cele din urmă, cuprinde și reprezintă o întreagă disciplină - și acesta a fost scopul nostru cu această carte de genetică.

Pentru a ajuta elevii să identifice aspectele conceptuale ale unui subiect important, fiecare capitol începe cu o secțiune numită *Concepte de capitol* , care identifică cele mai importante idei care urmează să fie prezentate. Fiecare capitol se încheie cu o nouă secțiune numită *Puncte de rezumat,* care enumeră cinci până la zece puncte cheie care au fost abordate. Iar în secțiunea *Cum știm?,* La începutul fiecărui capitol , elevilor li se cere să conecteze conceptele cu descoperirile experimentale. Luate împreună, acest lucru ajută la asigurarea faptului că elevii recunosc și înțeleg aspectele conceptuale cheie pe măsură ce se confruntă cu vocabularul extins și multe detalii importante ale geneticii. Figurile atent concepute completează, de asemenea, această abordare pedagogică pe tot parcursul cărții.

Aspecte cheie ale acestei ediții

- Organizare. Am continuat să acordăm atenție organizării materialului, aranjând capitolele într-o serie de secțiuni principale pentru a reflecta tendințele în schimbare din domeniul geneticii . În această ediție, au fost făcute mai multe modificări organizatorice importante. În primul rând, capitolul despre Tehnologia ADN-ului recombinant, integrat anterior cu subiectele de analiză și structură a ADN-ului din Partea a II-a, a fost mutat în Partea a IV-a (Capitolul 20), unde acum precede direct tratarea genomicii și biotehnologiei, pentru care servește drept bază experimentală. De asemenea, am integrat mai atent întregul tratament al genomicii în cele două capitole care urmează acestei introduceri în Partea a IV-a. A doua modificare majoră este concepută pentru a facilita tratarea geneticii populațiilor și evoluției de către instructori . Anterior, aceste subiecte erau prezentate în capitole separate. În ediția revizuită, am integrat tratarea ambelor subiecte într - un singur capitol (Capitolul 25) , îmbunătățind astfel legătura dintre cele două.
- Organisme model. Am continuat să subliniem utilizarea - organismelor model de către geneticieni , tratarea acestui subiect fiind distribuită în mai multe capitole, în special în Capitolul 1 — Introducere în genetică — și în Capitolul 18 — Genetica dezvoltării . În mod evident, utilizarea organismelor model în studiile genetice oferă baza tuturor cercetărilor genetice actuale.
- Pedagogie. După cum am menționat deja, unul dintre principalele obiective pedagogice ale acestei ediții este de a oferi informații în fiecare capitol pe care grupuri mici de elevi le pot folosi în sala de clasă sau ca teme de proiect pe care să le realizeze individual . Cercetările pedagogice continuă să indice marea utilitate și eficacitate a acestor *experiențe de învățare activă și cooperativă* . În acest scop, capitolele includ trei secțiuni care sporesc considerabil utilitatea acestei ediții .

  — Studiu de caz. Această nouă secțiune de la sfârșitul fiecărui capitol oferă o scurtă introducere la un subiect cotidian legat de genetică, urmată de o serie de întrebări pentru discuții . Utilizarea studiului de caz ar trebui să motiveze studenții să conecteze informațiile genetice nou dobândite cu problemele pe care le -ar putea întâlni în afara cursului.

  — Genetică, tehnologie și societate. Această secțiune oferă o prezentare generală a unui subiect legat de cercetarea actuală în domeniul geneticii , care are un impact direct asupra societății noastre. Acum include o nouă subsecțiune numită *„Rândul tău”,* care îi îndrumă pe studenți către resurse conexe , cum ar fi articole și site-uri web , pentru a le permite să își aprofundeze cercetarea și să exploreze subiectul principal al fiecărei secțiuni.

  — Explorarea genomicii . Această secțiune detaliază discuțiile din capitol pe anumite subiecte , explorând noi descoperiri rezultate din

studiile genomice. Studenților li se oferă indicații către site-uri web unde pot găsi „instrumentele” pe care oamenii de știință din întreaga lume le folosesc pentru a obține informații genomice actualizate.

Indiferent dacă instructorii folosesc aceste secțiuni pentru învățarea activă în sala de clasă sau pentru a atribui proiecte studenților pentru a le realiza în afara orelor de curs, este clar că aceste secțiuni vor încuraja utilizarea unor tehnici pedagogice actualizate pentru a facilita învățarea elevilor. Activitățile îi ajută pe studenți să se implice, iar conținutul fiecărei secțiuni asigură dobândirea de cunoștințe suficiente despre subiecte avansate din genetică.

Accent pe rezolvarea problemelor

Ca autori și profesori, am fost întotdeauna conștienți de importanța învățării elevilor să rezolve problemele eficient. Elevii au nevoie de îndrumare și de oportunitatea de a-și pune în practică cunoștințele pentru a dezvolta o gândire analitică solidă. În acest scop, prezentăm secțiuni diferite în fiecare capitol pentru a maximiza oportunitățile elevilor de a învăța cum să rezolve probleme și să aplice gândirea analitică.

- Acum rezolvați asta. Incluse de mai multe ori în text, aceste secțiuni prezintă o problemă similară cu cele de la sfârșitul capitolului și strâns legate de explicațiile oferite în text în acel moment . În fiecare caz, este oferită o sugestie pedagogică pentru a oferi indicii și a ajuta la rezolvarea problemei. Această sugestie leagă strâns explicațiile din text de problema pusă.
- Idei și soluții. Pentru a ajuta elevii să învețe să rezolve probleme, secțiunea *„Probleme și întrebări pentru discuții”* este precedată de una dintre cele mai populare și bine primite secțiuni ale acestui text. „Idei și soluții” pune probleme sau întrebări și oferă soluții detaliate sau informații analitice pe măsură ce răspunsul se dezvoltă . Întrebările și soluțiile lor sunt concepute pentru a pune accentul pe rezolvarea problemelor, analiza cantitativă, gândirea analitică și raționamentul experimental. Împreună , aceste abilități formează piatra de temelie a procesului științific de cercetare și descoperire.
- Probleme și întrebări pentru discuții. Fiecare capitol se încheie cu o colecție cuprinzătoare de *probleme și întrebări pentru discuții.* Sunt incluse diverse niveluri de dificultate , cele mai avansate probleme *(Probleme Extra Picante) fiind plasate în partea de sus.* la sfârșitul fiecărei secțiuni. Adesea, Problemele Extra-Picante sunt extrase din literatura de cercetare genetică actuală, cu sursele corespunzătoare citate întotdeauna . Răspunsuri scurte la toate problemele cu număr par sunt furnizate în Anexa B. Manualul *studentului și Manualul de soluții* răspund la toate problemele și sunt disponibile studenților ori de câte ori corpul didactic consideră necesar. După cum vor constata cititorii familiarizați cu edițiile anterioare , aproximativ 50 de probleme noi au fost incluse în text .
- Cum știm? Situată la începutul secțiunii Probleme și întrebări pentru discuții , această întrebare îi cere studentului să identifice și să examineze bazele experimentale care stau la baza mai multor concepte și concluzii importante prezentate în capitol. Răspunsul la aceste întrebări îl va ajuta pe student să înțeleagă mai bine, mai degrabă decât să memoreze , scopul final al fiecărui domeniu de cercetare. Această subsecțiune extinde abordarea pedagogică a biologiei, descrisă pentru - prima dată în mod oficial de John A. Moore în cartea sa din 1999 , Știința *ca modalitate de cunoaștere - Fundamentul biologiei moderne* .

Mulțumiri

Contribuitori

Începem prin a mulțumi în mod special celor care au contribuit direct la acest text. Suntem deosebit de recunoscători Sarei Ward de la Universitatea de Stat din Colorado pentru scrierea capitolului 26 despre Genetica conservării în urmă cu câteva ediții . Le mulțumim lui Joan Redd de la Universitatea Walla Walla și Juttei Heller de la Universitatea din Washington -Tacoma pentru munca lor la programul multimedia. De asemenea, le mulțumim lui David Kass de la Universitatea Eastern Michigan, lui Chaoyang Zeng de la Universitatea din Wisconsin - Milwaukee și Virginiei McDonough de la Hope College pentru sugestiile lor utile atât cu privire la subiectele textului , cât și la programul multimedia . În plus, Amanda Norvell, Janet Morrison și Katherine Uyhazi au oferit comentarii care ne-au permis să revizuim edițiile anterioare . Amanda și Janet sunt colaboratoare la The College of New Jersey, în timp ce Katherine s-a mutat la Universitatea Yale . Tamara Mans, care predă în prezent la North Hennepin Community College, ne -a ajutat și ea în timpul revizuirilor anterioare . Ca și în edițiile anterioare , Elliott Goldstein de la Universitatea de Stat din Arizona a fost întotdeauna disponibil pentru consultanță cu privire la cele mai recente descoperiri din genetica moleculară. De asemenea, dorim să-i mulțumim lui Harry

Nickla de la Universitatea Creighton . În calitate de autor al Manualului studentului *și al Manualului de soluții,* precum și al *Manualului de resurse al instructorului cu teste,* a revizuit și editat problemele de la sfârșitul capitolului și a scris multe dintre problemele noi. De asemenea, a oferit răspunsuri scurte la probleme selectate incluse în Anexa B.

Suntem foarte recunoscători tuturor acestor colaboratori nu doar pentru împărtășirea cunoștințelor lor despre genetică, ci și pentru dăruirea lor față de acest proiect, precum și pentru relația plăcută pe care ne-au permis să o menținem cu ei.

Corectori

Citirea manuscrisului unui manual de peste 800 de pagini merită mai multe mulțumiri decât pot exprima cuvintele . Cele mai sincere mulțumiri se îndreaptă către Darrell Killian de la Colegiul din New Jersey, care a corectat cu o precizie meticuloasă, și către Michael Rossa și Debra Gates , care au corectat întregul manuscris. Au abordat această sarcină cu răbdare și sârguință, contribuind în mare măsură la calitatea textului.

Recenzori

Textul în ansamblu se bazează pe îmbunătățirile semnificative aduse de numeroși recenzori. Deși ne asumăm întreaga responsabilitate pentru orice erori din carte, le mulțumim cu recunoștință celor care au revizuit conținutul și pedagogia acestei ediții și a celei anterioare.

Robert A. Angus, *Universitatea din Alabama, Birmingham*
Bruce Bejcek, *Universitatea Western Michigan* Peta Bonham-Smith, Universitatea din *Saskatchewan* Michael A. Buratovich, *Universitatea Spring Arbor Aaron Cassili* , Universitatea din *Texas* , *San Antonio*
Ashley Hagler, *Universitatea Carolina de Nord, Charlotte*
Jocelyn Krebs, *Universitatea din Alaska, Fairbanks* Paul F. Lurquin, *Universitatea de Stat din Washington* Virginia McDonough, *Colegiul Hope*
Kim McKim, *Universitatea Rutgers* Clint Magill, *Universitatea Texas A&M* Harry Nickla, *Universitatea Creighton* Mohamed Noor, *Universitatea Duke* Margaret Olney, *Universitatea Saint Martin*

John C. Osterman, *Universitatea din Nebraska-Lincoln* Gloria Regisford, *Universitatea Prairie View A&M* Rodney Scott, *Colegiul Wheaton*
Barkur Shastry, *Universitatea Oakland*
Linda Sigismondi, *Universitatea din Rio Grande*
Tara Turley Stoulig, *Universitatea Southeastern Louisiana*
Kenneth Wilson, *Universitatea din Saskatchewan* Fang-sheng Wu, *Universitatea Commonwealth din Virginia* Chaoyang Zeng, *Universitatea din Wisconsin, Milwaukee*

Mulțumiri speciale lui Mike Guidry de la LightCone Interactive și lui Karen Hughes de la Universitatea din Tennessee pentru contribuțiile lor originale la programul multimedia.

După cum reiese clar din mulțumirile anterioare, un text ca acesta este o strădanie colectivă. Toate persoanele menționate anterior merită să împărtășească orice succes pe care l-ar putea avea această carte. Vrem să le mulțumim că recunoștința noastră este dublată de dăruirea evidentă și extraordinară a eforturilor lor. Multe, multe mulțumiri tuturor.

Editorial și producție

La Pearson, ne exprimăm aprecierea și stima deosebită pentru comitetul editorial și pentru sugestiile lui Gary Carlson și, mai recent, ale lui Michael Gillespie, ale căror idei și eforturi au contribuit la rafinarea caracteristicilor acestei ediții a textului. Dusty Friedman, editorul nostru de proiect, a lucrat neobosit pentru a respecta termenele limită ale proiectului și standardele de calitate necesare . În plus, echipa noastră editorială - Deborah Gale, director executiv de dezvoltare; Laura Tommasi, producător multimedia senior; și Tania Mlawer, director de conținut editorial pentru Mastering Genetics - au oferit contribuții valoroase pentru ediția actuală. Aceștia au lucrat foarte creativ pentru a se asigura că pedagogia și designul cărții și al pachetului multimedia sunt cât mai avansate posibil în cadrul unei discipline în rapidă evoluție. Sudhir Nayak de la Colegiul din New Jersey a făcut o treabă excelentă pentru programul Mastering Genetics și îi suntem deosebit de recunoscători pentru contribuțiile sale pe tema genomicii . Camille Herrera a supravegheat meticulos și persistent fiecare detaliu al producției . Editarea manuscrisului a fost realizată de Betty Pessagno, căreia îi suntem extrem de recunoscători. Lauren Harp a gestionat cu profesionalism și entuziasm marketingul textului . În cele din urmă, ilustrațiile frumoase și coerente sunt opera Imagineering, din Toronto. Fără munca și dăruirea persoanelor menționate , acest text nu ar fi văzut niciodată lumina zilei.

1

Introducere în genetică

CONCEPTE CAPITOL

Genetica transmiterii cuprinde procesul general prin care o serie de trăsături controlate de factori specifici (gene) sunt transmise din generație în generație prin intermediul gameților . Principiile sale fundamentale au fost propuse pentru prima dată de Gregor Mendel la mijlocul secolului al XIX-lea . Lucrările ulterioare ale altor cercetători au demonstrat că genele sunt situate pe cromozomi și că tulpinile mutante pot fi utilizate pentru a cartografia genele pe cromozomi .

Descoperirea faptului că ADN -ul codifică informația genetică , rezoluția structurii ADN - ului și determinarea mecanismului de exprimare a genelor constituie fundamentul geneticii moleculare .

Tehnologia ADN-ului recombinant , care permite oamenilor de știință să prepare cantități mari de secvențe specifice de ADN, a revoluționat genetica , punând bazele unor noi domenii - și pentru companii precum Proiectul Genomului Uman - care combină genetica cu tehnologiile informației .

►► Biotehnologia include utilizarea organismelor modificate genetic și a produselor acestora într-o gamă largă de activități, în domeniile agriculturii , medicinei și industriei .

►► Unele dintre organismele model utilizate în cercetarea genetică de la începutul secolului al XX-lea sunt utilizate acum împreună cu tehnologia ADN-ului recombinant și genomică pentru a studia bolile umane.

►► Tehnologia genetică se dezvoltă mai rapid decât reglementările, legile și convențiile care guvernează utilizarea acesteia .

După câteva luni de dezbateri aprinse, în 1998, parlamentul islandez a adoptat o lege care acorda companiei deCODE Genetics, o companie de biotehnologie cu sediul în Islanda, o licență pentru a crea și opera o O bază de date care conține informații detaliate extrase din dosarele medicale ale celor 270.000 de locuitori ai Islandei. Înregistrările din această bază de date islandeză, numită Baza de Date a Sectorului de Sănătate (HSD) , sunt codificate pentru a asigura anonimatul. Noua lege a permis, de asemenea, deCODE Genetics să compare informațiile medicale din baza de date HSD cu o bază de date genealogică cuprinzătoare din arhivele naționale . În plus, deCODE Genetics a fost autorizată să coreleze informațiile din aceste două baze de date cu rezultatele profilurilor de acid dezoxiribonucleic (ADN) obținute de la donatori islandezi. Această combinație de informații medicale, genealogice și genetice constituie o resursă puternică, disponibilă exclusiv deCODE Genetics, care poate vinde aceste informații cercetătorilor și companiilor pentru o perioadă de 12 ani, începând cu anul 2000.

Acest scenariu este un exemplu tipic al interacțiunii din ce în ce mai complexe dintre genetică și societate , la care asistăm în această primă parte a secolului XXI. Dezvoltarea și utilizarea acestor baze de date în Islanda a dus la implementarea unor proiecte similare în alte țări. Cel mai mare dintre acestea este UK Biobank, inițiată în Marea Britanie în 2003. În cadrul acestui proiect, se compilează o bază de date uriașă cu informații genetice de la 500.000 de locuitori ai Regatului Unit, provenind dintr -un grup inițial de 1,2 milioane de locuitori. Baza de date va fi utilizată pentru a căuta gene de susceptibilitate care controlează trăsături complexe. Alte proiecte similare au fost anunțate ulterior în Estonia, Lituania, Suedia , Singapore și Regatul Tonga , în timp ce în Statele Unite, alte proiecte la scară mai mică , care implică zeci de mii de persoane, sunt dezvoltate la Clinica Marshfield din Marshfield, Wisconsin; Universitatea Northwestern din Chicago, Illinois ; și Universitatea Howard din Washington, D.C.

deCODE Genetics a selectat Islanda pentru acest proiect fără precedent deoarece poporul islandez are un nivel de uniformitate genetică rar întâlnit sau accesibil cercetării științifice. Acest grad ridicat de înrudire genetică provine din repopularea Islandei în urmă cu aproximativ 1.000 de ani de către o populație mică , de origine predominant scandinavă și celtică . Scăderile periodice ulterioare ale populației din cauza bolilor și dezastrelor naturale au redus și mai mult diversitatea genetică a țării și, până acum câteva decenii, au sosit puțini imigranți pentru a introduce noi gene în populație. În plus, deoarece sistemul public de sănătate din Islanda este administrat de stat , există dosare medicale pentru toți locuitorii încă de la începutul secolului al XX-lea . Informațiile genealogice sunt disponibile în Arhivele Naționale și în registrele parohiale pentru aproape toți locuitorii și pentru peste 500.000 dintre cele aproximativ 750.000 de persoane care au trăit vreodată în Islanda. Din toate aceste motive, datele islandeze constituie un atu extrem de valoros pentru geneticienii care încearcă să identifice genele care controlează bolile complexe. Proiectul se poate mândri deja cu o serie de succese . Oamenii de știință de la deCODE Genetics au identificat gene asociate cu peste o duzină de boli comune, inclusiv astm , atacuri de cord, accident vascular cerebral și osteoporoză.

Cealaltă față a acestor succese este problema confidențialității , consimțământului și comercializarii - probleme aflate în centrul multor controverse care decurg din aplicarea tehnologiei genetice. Atât oamenii de știință, cât și cei care nu sunt oameni de știință - dezbat soarta și controlul informațiilor genetice, precum și rolul legii, al individului și al societății în deciziile privind modul și momentul utilizării tehnologiei genetice . De exemplu, cum ar trebui utilizată cunoașterea secvenței complete de nucleotide a genomului uman? Ar trebui ca tehnologiile genetice, cum ar fi diagnosticul prenatal sau terapia genică, să fie disponibile tuturor, indiferent de mijloacele lor financiare ? Mai mult decât oricând în istoria științei, abordarea întrebărilor etice din jurul acestei tehnologii emergente este la fel de importantă ca și informațiile în sine obținute din ea.

Acest capitol introductiv oferă o prezentare generală a geneticii , trecând în revistă unele dintre cele mai importante etape din istoria sa și oferind descrieri preliminare ale principiilor sale fundamentale și ale evoluțiilor recente. Toate subiectele discutate în acest capitol vor fi explorate mult mai detaliat în altă parte a cărții. Capitolele ulterioare vor examina, de asemenea , controversele la care am făcut aluzie și vor aborda multe alte probleme care fac în prezent obiectul dezbaterii. Nu a existat niciodată un moment mai interesant pentru a aprofunda știința trăsăturilor ereditare , dar nici nevoia de prudență și conștientizare a consecințelor sociale nu a fost vreodată mai evidentă . Acest text vă va permite să dobândiți o înțelegere aprofundată a geneticii moderne și a principiilor sale fundamentale. Pe parcurs , bucurați -vă de studii, dar luați -vă foarte în serios responsabilitatea de genetician începător

.

Genetica are o istorie bogată și interesantă

Nu știm când au recunoscut oamenii pentru prima dată existența eredității , dar dovezile arheologice (de exemplu, arta primitivă, -oasele și craniile conservate și semințele uscate) documentează succesul domesticirii animalelor și al cultivării plantelor cu mii de ani în urmă, prin selecția artificială a variantelor genetice în cadrul anumitor populații. Între anii 8000 și 1000 î.Hr., caii, cămilele, vitele și mai multe rase de câini (derivați din familia lupilor) au fost domesticite, urmate curând de reproducere selectivă . Cultivarea multor plante, inclusiv porumbul, grâul , orezul și curmalii , a început în jurul anului 5000 î.Hr. Rămășițe de porumb care datează din această perioadă au fost găsite în unele peșteri din Valea Tehuacán din Mexic. Astfel de dovezi documentează încercările de succes ale strămoșilor noștri de a manipula structura genetică a speciilor .

Deși puține, dacă nu chiar niciuna, idei semnificative au fost propuse pentru a explica ereditatea în timpurile preistorice, în timpul Epocii de Aur a culturii grecești, o serie de filozofi au scris despre acest subiect în raport cu ființele umane . Acest lucru este evident în scrierile Școlii de Medicină Hipocratice (500-400 î.Hr.) și ale filosofului și naturalistului Aristotel (384-322 î.Hr.). Tratatul lui Hipocratic *despre sământă* susținea că o serie de „umori" active în diferite părți ale corpului masculin serveau drept purtători ai caracteristicilor ereditare. Extrase din diferite părți ale corpului masculin de către spermă și transmise urmașilor, aceste umori puteau fi sănătoase sau bolnave, starea bolnavă fiind responsabilă de apariția nou -născuților cu deformități sau boli congenitale. De asemenea, se credea că aceste umori puteau fi modificate la indivizi înainte de a fi transmise urmașilor lor, ceea ce ar explica modul în care nou-născuții puteau „moșteni" caracteristici pe care părinții lor le-au „dobândit " prin interacțiunea lor cu mediul.

Aristotel, care a studiat cu Platon timp de aproximativ douăzeci de ani, a dezvoltat gândirea lui Hippocrate și a propus că puterea generativă a spermei masculine rezidă într-o „ căldură vitală" conținută în aceasta, care avea capacitatea de a produce urmași de aceeași formă (adică, cu structură și capacități de bază) ca tatăl. Aristotel credea că această căldură gătea și modela fluxul menstrual produs de femeie , care era „ substanța fizică" ce dădea naștere unui urmaș. Embrionul se dezvolta nu pentru că conținea deja părțile miniaturale ale corpului uman (așa cum credea unii Hippocrate), ci datorită puterii modelatoare a căldurii vitale. Deși ideile lui Aristotel și Hippocrate sună primitive și copilărești astăzi, este important să ne amintim că înainte de secolul al XIX-lea, nici spermatozoizii, nici ovulele nu fuseseră observate la mamifere.

1600-1850: zorii biologiei moderne

În următorii 1900 de ani (din 300 î.Hr. până în 1600), înțelegerea noastră asupra geneticii nu a fost extinsă prin nicio idee nouă sau semnificativă . Cu toate acestea, între 1600 și 1850, mai mulți pași importanți au avansat înțelegerea noastră asupra bazelor biologice ale vieții, pregătind terenul pentru lucrările și principiile inovatoare prezentate de Gregor Mendel și Charles Darwin. În secolul al XVII-lea, anatomistul englez William Harvey (1578–1657) a scris un -tratat despre reproducere și dezvoltare bazat pe opera lui Aristotel. Lui i se atribuie prima formulare a epigenezei, care afirmă că organismele sunt derivate din substanțe prezente în ovul care se diferențiază în structuri adulte în timpul dezvoltării embrionare . Epigeneza susține că structuri precum organele corpului nu sunt inițial prezente în stadiile incipiente ale embrionului , ci se formează *de novo* . (din nou).

Această teorie intra în conflict direct cu teoria preformării , propusă pentru prima dată în secolul al XVII - lea , care afirma că celulele sexuale conțineau un adult miniatural complet, perfect în fiecare detaliu, numit homunculus (Figura 1.1). Deși această teorie a fost ulterior abandonată, alte descoperiri semnificative în chimie și biologie din aceeași perioadă au influențat gândirea științifică viitoare . În jurul anului 1830, Matthias Schleiden și Theodor Schwann au propus teoria celulară, care afirmă că toate organismele sunt compuse din unități de bază numite celule, care sunt derivate din structuri preexistente similare . Ideea generației spontane - crearea de organisme vii din componente nevii - a fost infirmată de Louis Pasteur mai târziu în acel secol , și s-a acceptat faptul că organismele vii erau derivate din organisme preexistente și erau compuse din celule.

noțiune extrem de influentă, predominantă în secolul al XIX-lea, a fost natura fixă a speciilor. Conform acestei doctrine, grupurile de animale și plante au rămas neschimbate ca formă de la apariția lor pe Pământ . Această doctrină a fost îmbrățișată, în special, de cei care credeau într -o creație specială, inclusiv de medicul și taxonomul suedez al plantelor Carolus Linnaeus (1707–1778), care este amintit în special pentru dezvoltarea sistemului binomial de clasificare a speciilor .

FIGURA 1.1 Desen al „homunculului*, un spermatozoid care conține un adult miniatural, perfect în proporțiile sale și complet format. (Hartsoeker, N. Essay de dioptrica Paris, 1694, p. 230. Biblioteca Națională de Medicină).

Charles Darwin și evoluția

Având în vedere acest context, vom explica pe scurt opera lui Charles Darwin, care și-a publicat teoria evoluției în 1859 în cartea **Originea speciilor**. Observațiile geologice, geografice și biologice ale lui Darwin l-au convins că speciile existente au apărut prin descendență și modificare din alte specii ancestrale. Puternic influențat de călătoria sa pe HMS *Beagle* (1831-1836), gândirea lui Darwin a culminat cu formularea teoriei sale despre selecția naturală , care a oferit o explicație pentru cauzele schimbării evolutive. Formulată și propusă independent de Alfred Russel Wallace, selecția naturală s-a bazat pe observația că populațiile tind să aibă mai mulți urmași decât poate susține mediul, ceea ce duce la o luptă pentru supraviețuire în rândul acestor urmași. Organismele cu trăsături ereditare care le permit să se adapteze la mediul lor au mai multe șanse să supraviețuiască și să se reproducă decât cele cu trăsături mai puțin avantajoase . Pe o perioadă lungă de timp, se va acumula o serie de variații mici, dar avantajoase . Dacă o populație care poartă aceste variații moștenite devine izolată reproductiv , - poate apărea o nouă specie .

Totuși, lui Darwin îi lipsea o înțelegere a bazei genetice a variației ereditare , o deficiență care a lăsat teoria sa deschisă unor critici rezonabile. Cu toate acestea , după cum vom vedea, lucrările lui Gregor Mendel din anii 1850 și redescoperirea lor la începutul secolului al XX-lea aveau să ofere în curând fundamentul pentru interpretarea propunerii lui Darwin. Treptat, a devenit clar că variația moștenită depinde de informațiile genetice care se află într-o serie de gene conținute pe cromozomi .

IM

Genetica a progresat de la Mendel la ADN în mai puțin de un secol

Adevăratul punct de plecare pentru înțelegerea geneticii este grădina unei mănăstiri din Europa Centrală la mijlocul secolului al XIX-lea , unde Gregor Mendel , un călugăr augustinian , a efectuat o serie de experimente folosind plante de mazăre pe parcursul unui deceniu. Mendel a aplicat tehnici cantitative de analiză a datelor rezultatelor sale și a demonstrat că trăsăturile sunt transmise de la părinți la urmași într -un mod previzibil . Din munca sa, el a concluzionat că fiecare trăsătură a plantei este controlată de o pereche de gene și că, în timpul formării gameților (formarea ovulelor și spermatozoizilor), membrii fiecărei perechi de gene se separă unul de celălalt. Lucrarea sa a fost publicată în 1866, dar a fost în mare parte ignorată până când a fost reprodusă parțial și citată în articole de Carl Correns și alții în jurul anului 1900. După ce au fost confirmate de alții, descoperirile lui Mendel au fost recunoscute ca explicație pentru transmiterea trăsăturilor la plantele de mazăre și la toate celelalte organisme superioare . Lucrarea sa stă la baza geneticii, care este definită ca ramura biologiei care se ocupă cu studiul eredității și variației. Vom explica în detaliu genetica mendeliană în Capitolul 3.

Teoria cromozomială a moștenirii

Mendel și- a efectuat experimentele înainte ca structura și rolul cromozomilor să fie cunoscute . La aproximativ douăzeci de ani după publicarea lucrării sale , progresele în microscopie au permis cercetătorilor să identifice cromozomii și să stabilească faptul că, în majoritatea organismelor eucariote , membrii fiecărei specii au un număr caracteristic de cromozomi, numărul diploid (2n), în majoritatea celulelor lor. De exemplu, oamenii au un număr diploid de 46 (Figura 1.2). În celulele diploide,

FIGURA 1.2 Imagine colorată a complementului cromozomial al unui bărbat. Aranjat în acest fel, complementul se numește cariotip.

Cromozomii apar în perechi, numiți cromozomi omologi . Membrii fiecărei perechi sunt identici ca mărime și locație a centromerului, care este o structură de care se atașează fibrele fusului de asamblare în timpul diviziunii celulare .

al XIX-lea au descris comportamentul cromozomilor în timpul celor două forme de diviziune celulară, mitoză și meioză. În mitoză , cromozomii sunt copiați și distribuiți în așa fel încât fiecare dintre cele două celule fiice rezultate primește un set diploid de cromozomi. Meioza este asociată cu formarea gameților . Celulele produse prin meioză primesc doar un cromozom pentru fiecare pereche de cromozomi, caz în care numărul rezultat de cromozomi se numește număr haploid (n). Această reducere a numărului de cromozomi este esențială dacă urmașii rezultați din unirea a doi gameți vor menține, de-a lungul generațiilor , numărul constant de cromozomi caracteristic părinților lor și altor membri ai speciei lor.

La începutul secolului al XX-lea, Walter Sutton și Theodore Boveri au observat independent că genele (așa cum emisese ipoteza lui Mendel) și cromozomii (așa cum se observau la microscop) au mai multe proprietăți comune și că comportamentul cromozomilor în meioză este identic cu presupusul comportament al genelor în timpul formării gameților , așa cum este descris de Mendel . De

J quêtas escutelares, *se* l '
ojos blancos, *w*

ojos color rubí, *rb*

aripi fără vene transversale, *cv.*

quetas carbonizate, *sn*

- - ochi romboizi, *stânga*

Am ochi vermilion, *v*

corp întunecat, s

aripi festonate, sd

exemplu, genele și cromozomii

-i - ochi în Barra, B

ojos color clavel, *car*

tamaño pequeno, *lf*

FIGURA 1.3 Cromozomul I (cromozomul X, adică unul dintre cromozomii care determină sexul) al lui *D. melanogaster,* care prezintă localizarea diferitelor gene. Cromozomii pot conține sute de gene.

Genele se găsesc în perechi, iar membrii unei perechi de gene și ai unei perechi de cromozomi se separă în timpul formării gameților. Pe baza acestor paralele, Sutton și Boveri au propus independent că genele sunt purtate de cromozomi (Figura 1.3). Această propunere stă la baza teoriei cromozomiale a moștenirii , care afirmă că trăsăturile ereditare sunt controlate de gene situate pe cromozomi, care sunt transmise cu fidelitate prin gameți, menținând continuitatea genetică de la o generație la alta.

Geneticienii au descoperit numeroase exemple distincte de trăsături ereditare între 1910 și aproximativ 1940 , ceea ce le -a permis să testeze teoria în mod repetat. Modelele de moștenire variau uneori de exemplele simple descrise de Mendel, dar teoria

cromozomială a moștenirii putea fi întotdeauna aplicată . Această teorie continuă să explice modul în care trăsăturile sunt transmise din generație în generație în diverse organisme, inclusiv la oameni .

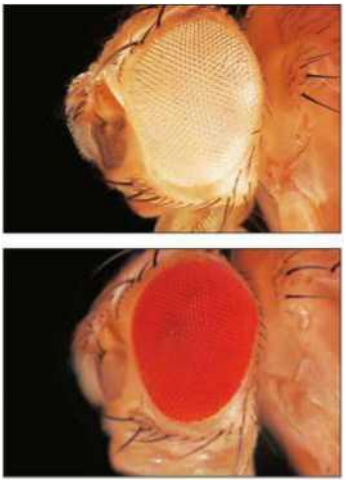


FIGURA 1.4 Culoarea normală a ochilor roșii la *D. melanogaster* (jos) și mutantul cu ochi albi (sus).

Variația genetică

a fost propusă teoria cromozomială a moștenirii , oamenii de știință au început să studieze moștenirea trăsăturilor la musca de fructe, *Drosophila melanogaster. O muscă cu ochi albi* (Figura 1.4) a fost descoperită într-o sticlă care conținea musce normale (de tip sălbatic) cu ochi roșii. Această variație a apărut dintr -o mutație a uneia dintre genele care controlează culoarea ochilor. Mutațiile sunt definite ca modificări ereditare și reprezintă sursa tuturor variațiilor genetice.

Gena variantă a culorii ochilor descoperită la Drosophila *este o* alelă a genei care controlează culoarea ochilor . Alelele sunt definite ca forme alternative ale unei gene. Alele diferite pot produce diferențe în trăsăturile observabile ale unui organism , sau fenotip . Setul de alele pe care un organism le are pentru o anumită trăsătură se numește genotip. Folosind gene mutante ca markeri, geneticienii au reușit să cartografieze locația diferitelor gene pe cromozomi (Figura 1.3).

Investigarea naturii chimice a genelor: ADN sau proteine?

Lucrările cu *Drosophila* cu ochi albi au demonstrat că trăsătura mutantă ar putea fi atribuită unui singur cromozom , confirmând ideea că genele sunt situate pe cromozomi. Odată ce această relație a fost stabilită, cercetătorii și-au concentrat atenția asupra identificării componentei chimice a cromozomilor care poartă informații genetice. Până în anii 1920, oamenii de știință identificaseră ADN - ul și proteinele drept principalele componente chimice ale cromozomilor . Dintre cele două , proteinele sunt cele mai abundente componente ale celulelor . Există un număr mare de proteine diferite și, datorită distribuției lor universale în nucleu și citoplasmă , mulți cercetători au crezut că proteinele ar putea fi purtătoarele de informații genetice.

În 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod și Maclyn McCarty, trei cercetători de la Institutul Rockefeller din New York, au furnizat dovezi experimentale că ADN-ul poartă informații genetice în bacterii . Aceste dovezi, deși clare, nu i-au convins pe mulți oameni de știință influenți . Dovezi suplimentare privind rolul ADN-ului ca purtător de informații genetice au fost furnizate de alți cercetători care lucrau cu virusuri care infectează și ucid bacteria *Escherichia* coli . (Figura 1.5). Virusurile care atacă bacteriile se numesc bacteriofagi sau, pe scurt, fagi și, la fel ca toți virusurile , constau dintr-un înveliș proteic care înconjoară un nucleu de ADN. Aceste experimente au demonstrat că, în timpul infecției , învelișul proteic al virusului rămâne în afara celulei bacteriene , în timp ce ADN-ul intră în celulă și direcționează sinteza și construirea mai multor fagi . Această dovadă că ADN-ul poartă informații genetice, împreună cu alte cercetări efectuate în anii următori , au oferit dovezi solide că ADN-ul , și nu proteinele, este materialul genetic, punând bazele lucrărilor care aveau să stabilească ulterior structura ADN-ului.

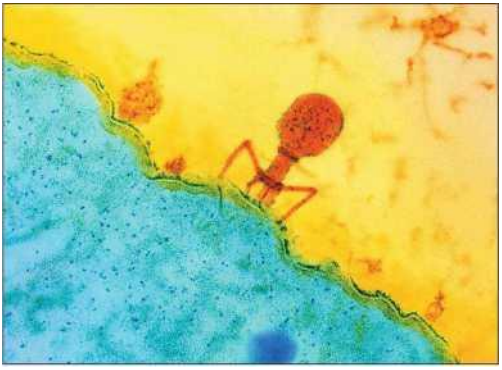


FIGURA 1.5 Micrografie electronică a unui fag T care infectează o celulă a bacteriei *E. coli* .

1.3

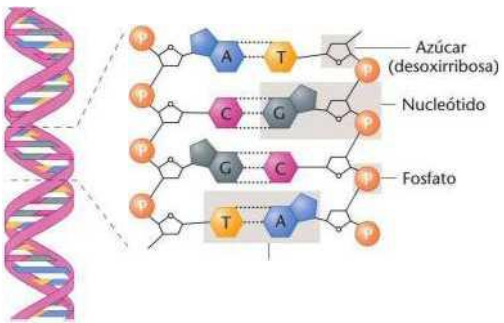
Descoperirea dublei helixuri a inaugurat era geneticii moleculare

Odată ce s-a acceptat faptul că ADN-ul este purtător de informații genetice , eforturile s-au concentrat pe descifrarea structurii moleculei de ADN și a mecanismului prin care informațiile stocate în acea moleculă sunt exprimate pentru a produce o trăsătură observabilă, numită fenotip . În anii care au urmat acestei realizări, cercetătorii au învățat să izoleze și să copieze regiuni specifice ale moleculelor de ADN, inaugurând era tehnologiei ADN-ului recombinant.

Structura ADN-ului și ARN-ului

ADN-ul este o macromoleculă lungă, asemănătoare unei scări , care se răsucește pentru a forma o dublă spirală (Figura 1.6). Fiecare - catenă a spiralei este un polimer liniar format din subunități numite nucleotide. Există patru nucleotide diferite în ADN. Fiecare nucleotid de ADN conține una dintre cele patru baze azotate, abreviate ca A (adenină), G (guanină), T (timină) sau C (citozină). Aceste patru baze, în diferite combinații , specifică în cele din urmă secvențele de aminoacizi ale proteinelor. Una dintre marile descoperiri ale secolului XX a fost făcută în 1953 de James Watson și Francis Crick, care au stabilit că cele două catene de ADN sunt exact complementare una cu cealaltă.

FIGURA 1.6 Structura ADN-ului, ilustrând aranjamentul dublei spirale (stânga) și componentele chimice care alcătuiesc fiecare catenă (dreapta). Liniile punctate dintre baze reprezintă legături chimice slabe, numite legături de hidrogen, care țin împreună cele două catene ale spiralei de ADN, astfel



încât treptele scării din dubla spirală sunt întotdeauna compuse din perechi de baze A = T sau G = C. Împreună cu Maurice Wilkins, Watson și Crick au primit Premiul Nobel în 1962 pentru munca lor asupra structurii ADN-ului. O relatare la persoana întâi a cursei pentru descoperirea structurii ADN-ului este oferită în cartea * *Dubla spirală**, scrisă de James Watson. Vom discuta despre structura ADN-ului în Capitolul 10.

ARN-ul, un alt acid nucleic, este similar chimic cu ADN-ul, dar conține un zahăr diferit (riboză în loc de dezoxiriboză) în nucleotidele sale. De asemenea, conține baza azotată uracil în loc de timină. În cele din urmă, spre deosebire de structura cu dublă helix a ADN-ului, ARN-ul este în general monocatenar. O caracteristică importantă este că o catenă de ARN poate forma structuri complementare atât cu catenele de ADN, cât și cu cele de ARN.

Expresia genelor: de la ADN la fenotip

Așa cum am mai spus, complementaritatea dintre nucleotide este baza expresiei genelor, setul de evenimente care determină o genă să dea naștere unui fenotip. Acest proces începe în nucleu cu transcripția, în timpul căreia secvența de nucleotide de pe una dintre catenele de ADN este utilizată pentru a construi o secvență de ARN complementară (partea de sus a Figurii 1.7). Odată ce o moleculă de ARN a fost generată , aceasta se deplasează în citoplasmă . Pentru sinteza proteinelor , ARN-ul - numit ARN mesager sau ARNm pe scurt - se leagă de un ribozom. Sinteza proteinelor sub conducerea ARNm se numește translație (mijlocul Figurii 1.7). Proteinele, ca produs final al genelor , sunt polimeri alcătuiți din monomeri de aminoacizi. Există 20 de aminoacizi diferiți care se găsesc în mod obișnuit în proteine .

Cum direcționează informația conținută în ARNm inserarea anumitor aminoacizi în lanțurile proteice în timpul sintezei proteinelor? Informația codificată în ARNm , numită cod genetic , constă dintr-o serie liniară de tripleți de nucleotide. Fiecare triplet, numit codon, este complementar informațiilor stocate în ADN și specifică inserarea unui anumit aminoacid într -o proteină. Asamblarea proteinelor se realizează cu ajutorul unor molecule adaptoare numite ARN de transfer (ARNt). În interiorul ribozomului , ARNt- urile recunosc informația codificată în codonii ARNm și transportă aminoacizii corespunzători pentru construcția proteinelor în timpul traducerii .

După cum arată explicațiile precedente , ADN-ul produce ARN , care în majoritatea cazurilor produce proteine. Această secvență de evenimente, cunoscută sub numele de dogma centrală a geneticii, are loc cu o mare specificitate. Folosind un alfabet de doar patru litere (A, T , C și G), genele direcționează

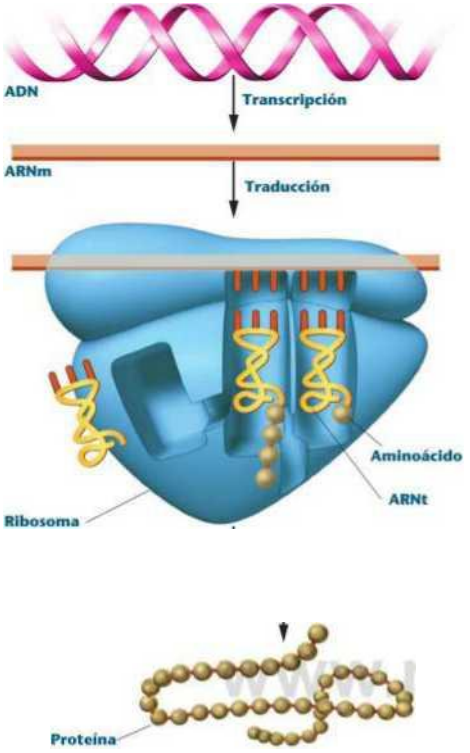


FIGURA 1.7 Expresia genelor constă în transcripția ADN-ului în ARNm (sus) și traducerea (centru) ARNm (cu ajutorul unui ribozom) într-o proteină (jos).

sinteza proteinelor extrem de specifice, care împreună servesc drept bază pentru toate funcțiile biologice .

Proteinele și funcția biologică

După cum am menționat, proteinele sunt produsele finale ale expresiei genelor. Aceste molecule sunt responsabile pentru conferirea proprietăților ființelor vii. Diversitatea proteinelor și funcțiile biologice pe care le pot îndeplini - diversitatea vieții însăși - provine din faptul că proteinele sunt formate din combinații de 20 de aminoacizi diferiți. Să luăm în considerare faptul că un lanț proteic care conține 100 de aminoacizi poate avea oricare dintre cei 20 de aminoacizi existenți în fiecare poziție . Prin urmare, numărul de secvențe proteice diferite compuse din 100 de aminoacizi va fi egal cu:

$$20^{*\text{‘‘}}$$

Întrucât 20^{1} * 1 este mai mare decât 5 x 10^{12} , adică 5 trilioane , imaginați-vă cât de mare este numărul 2^{0100} ! Numărul enorm de secvențe posibile de aminoacizi din proteine duce la variații incredibile în configurațiile lor tridimensionale posibile. Evident, proteinele sunt molecule care au potențialul de a oferi o diversitate structurală enormă și de a servi drept principală structură de susținere a sistemelor biologice.

Cea mai numeroasă clasă de proteine sunt enzimele. Aceste molecule servesc drept catalizatori biologici, permițând în esență reacțiilor biochimice să se desfășoare la rata necesară pentru susținerea vieții. Prin scăderea energiei de activare a reacțiilor, enzimele permit metabolismului celular să funcționeze la temperatura corpului, când în mod normal aceste reacții ar necesita o presiune sau o căldură intensă pentru a avea loc.

Pe lângă enzime, există și alte proteine care sunt componente esențiale ale celulelor și organismelor. Acestea includ hemoglobina, pigmentul din globulele roșii care transportă oxigen; insulina, un hormon pancreatic; colagenul, o moleculă a țesutului conjunctiv; keratina, o moleculă structurală a părului; histonele, proteine care formează structura cromozomilor în organismele eucariote (adică organisme ale căror celule au nucleu); actina și miozina, proteine contractile ale mușchilor; și imunoglobulinele, molecule de anticorpi ale sistemului imunitar . Forma și comportamentul chimic al fiecărei proteine sunt determinate de secvența sa liniară de aminoacizi, care, la rândul ei, este dictată de informațiile stocate în ADN -ul unei gene. Aceste informații sunt transferate către ARN, care apoi dirijează sinteza proteinelor. Pentru a reitera ideea fundamentală : *ADN-ul produce ARN, care apoi produce proteine.*

Legătura dintre genotip și fenotip: anemia falciformă

Odată ce o proteină a fost sintetizată, comportamentul său biochimic sau structural în cadrul unei celule joacă un rol în producerea unui fenotip. Atunci când o mutație modifică o genă, aceasta poate modifica sau chiar elimina funcția obișnuită codificată a proteinei și poate duce la apariția unui fenotip modificat. Pentru a urmări lanțul de evenimente care duc de la sinteza unei anumite proteine la prezența unui anumit fenotip, vom examina anemia falciformă, o tulburare genetică umană.

Anemia falciformă este cauzată de o formă mutantă de hemoglobină, proteina care transportă oxigenul de la plămâni la celulele organismului. Hemoglobina este o moleculă compozită formată din două polipeptide distincte, α-globină și β-globină, fiecare codificată de o genă diferită. Fiecare moleculă funcțională de hemoglobină conține două lanțuri de α-globină și două lanțuri de β-globină. În anemia falciformă, o mutație a genei care codifică β-globina are ca rezultat substituția unuia dintre cei 1,46 de aminoacizi din proteină. Figura 1.8 prezintă o parte din secvența

ADN , codonii ARNm corespunzători și secvența de aminoacizi ai formelor normale și mutante de β-globină. Rețineți că mutația din anemia falciformă implică o modificare a unui singur nucleotid în ADN, determinând schimbarea codonului 6 al ARNm din GAG în GUG, ceea ce, la rândul său, schimbă al 6-lea aminoacid din β-globină din acid glutamic în valină. Ceilalți 145 de aminoacizi ai proteinei nu sunt afectați de această mutație.

Persoanele cu două copii mutante ale genei β-globinei vor dezvolta anemie falciformă. Proteinele lor mutante de β-globină determină polimerizarea moleculelor de hemoglobină din globulele roșii atunci când concentrația de oxigen din sânge este scăzută, formând lanțuri lungi de hemoglobină care distorsionează forma globulelor roșii (Figura 1.9). Celulele deformate sunt fragile și se rup.

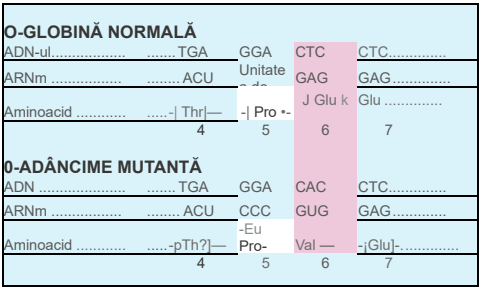

O-GLOBINĂ NORMALĂ
ADN-ul..... .....TGA GGA CTC CTC.....
ARNm .... ACU Unitate GAG GAG.....
Aminoacid ....-| Thr|— -| Pro •- J Glu k Glu .....
4 5 6 7
0-ADÂNCIME MUTANTĂ
ADN .... TGA GGA CAC CTC.....
ARNm .... ACU CCC GUG GAG.....
Aminoacid ....-pTh?}— -Eu Pro- Val — -¡Glu}-.....
4 5 6 7

FIGURA 1.8 O modificare a unui singur nucleotid în ADN -ul care codifică β-globina (CTC → CAC) are ca rezultat un codon modificat în ARNm (GAG GUG) și inserarea unui aminoacid diferit (glu → val), producând versiunea modificată a proteinei β-globinei, ceea ce duce la anemia falciformă.

FIGURA 1.9 Celule roșii normale (rotunjite) și celule falciforme. Anemia falciformă se acumulează, blocând capilarele și vasele mici de sânge.

ușor, astfel încât numărul de globule roșii circulante scade , provocând anemie . În plus, atunci când globulele roșii au formă de seceră, acestea blochează fluxul sanguin în capilare și vasele mici de sânge , provocând dureri acute și leziuni grave ale inimii , creierului , mușchilor și rinichilor . Toate simptomele acestei boli sunt cauzate de o modificare a unui singur nucleotid într -o genă , care modifică aminoacidul din molecula de β - globină , demonstrând relația strânsă dintre genotip și fenotip .

m.

Dezvoltarea tehnologiei ADN-ului recombinant a inaugurat era clonării.

Era ADN-ului recombinant a început la începutul anilor 1970, când cercetătorii au descoperit că bacteriile se protejează de infecțiile virale prin sintetizarea de enzime care taie ADN-ul viral în puncte specifice . Atunci când este tăiat de aceste enzime , ADN -ul viral nu mai poate direcționa sinteza mai multor particule de fag . Oamenii de știință și- au dat seama rapid că astfel de enzime, numite enzime de restricție, puteau fi utilizate pentru a tăia ADN-ul oricărui organism la secvențe nucleotidice specifice , producând o serie de fragmente într -un mod reproductibil. Aceasta a stat la baza dezvoltării clonării ADN - ului , o modalitate de a produce un număr mare de copii ale secvențelor de ADN .

La scurt timp după ce cercetătorii au descoperit că enzimele de restricție generau fragmente specifice de ADN , au fost dezvoltate metode pentru a insera aceste fragmente în molecule de ADN purtător , numite vectori , pentru a produce molecule de ADN recombinant și a le transfera în celulele bacteriene. Pe măsură ce celulele bacteriene se reproduc, sunt generate mii de copii, sau clone, ale combinației vectorului și fragmentelor de ADN (Figura 1.10). Aceste copii clonate pot fi recuperate de la bacterii , izolând astfel cantități mari din fragmentul de ADN clonat. Odată ce cantități mari de fragmente specifice de ADN au fost disponibile prin clonare , acestea au fost utilizate în multe moduri diferite: pentru a izola gene , pentru a studia organizarea și expresia lor și pentru a examina secvența și evoluția lor nucleotidelor .

Pe măsură ce tehnicile au fost rafinate, a devenit posibilă clonarea unor fragmente de ADN din ce în ce mai mari , deschizând calea pentru crearea unor colecții de clone care reprezintă genomul unui organism , care este conținutul haploid complet al ADN-ului specific al organismului respectiv . Colecțiile de clone care conțin un

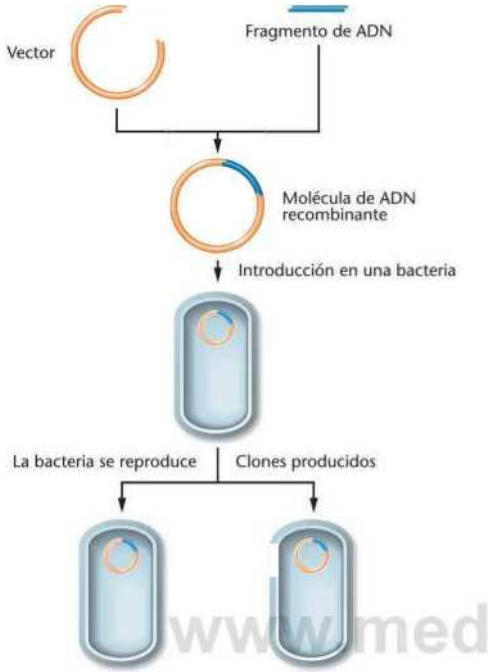


FIGURA 1.10 En la clonación, un vector y un fragmento de ADN, producido al cortar con una enzima de restricción, se unen para producir una molécula de ADN recombinante. El ADN recombinante se transfiere a una bacteria, en donde se clona produciendo muchas copias por replicación de la molécula recombinante y por división de la bacteria.

...

Genomurile complete se numesc biblioteci genomice. În prezent, biblioteci genomice sunt disponibile pentru sute de organisme.

Tehnologia ADN-ului recombinant nu numai că a accelerat considerabil ritmul cercetării, dar a dat naștere și industriei biotehnologice, care a crescut în ultimii 30 de ani până a devenit o parte importantă a economiei SUA.

1,5

Impactul biotehnologiei este în creștere

Fără a atrage prea multă atenție în Statele Unite, biotehnologia a revoluționat multe aspecte ale vieții de zi cu zi. Omenirea a folosit microorganisme, plante și animale timp de mii de ani, dar dezvoltarea tehnologiei ADN -ului recombinant și a tehnicilor asociate ne permite să modificăm genetic organismele în moduri noi și să le folosim, sau produsele lor, pentru a ne îmbunătăți viața. Biotehnologia este utilizarea acestor organisme modificate sau a produselor lor. Rezultatele sale sunt evidente astăzi în supermarketuri; cabinete medicale ; farmacii, magazine universale , spitale și clinici; în ferme și în sere ; în domeniile criminologiei și pensiei alimentare pentru copii ordonate de instanță ; și chiar în industria chimică. În Capitolul *22,* Vom vorbi în detaliu despre aplicațiile biotehnologiei, dar deocamdată , haideți să examinăm impactul pe care biotehnologia îl are asupra unui set restrâns de exemple extrase din viața de zi cu zi .

Plante, animale și aprovizionare cu alimente

Modificarea genetică a plantelor cultivate este unul dintre domeniile biotehnologiei cu cea mai rapidă creștere . Eforturile s-au concentrat pe trăsături precum rezistența la erbicide, insecte și virusuri ; conținutul crescut de ulei ; și coacerea întârziată (Tabelul 1.1). În prezent, peste o duzină de plante cultivate modificate genetic au fost aprobate pentru utilizare comercială în Statele Unite, alte 85 fiind testate în prezent pe câmp . Porumbul și soia rezistente la erbicide au fost cultivate pentru prima dată la mijlocul anilor 1990, iar acum aproximativ 40% din cultura de porumb și 95 % din cultura de soia din Statele Unite sunt modificate genetic . În plus, peste 60 % din cultura de canola și 85 % din cultura de bumbac sunt cultivate din soiuri modificate genetic . Se estimează că peste 75 % din alimentele procesate din Statele Unite conțin ingrediente din plante cultivate modificate genetic.

Unele trăsături modificate genetic la plantele cultivate

Rezistența la erbicide
Porumb, Soia, Orez, Bumbac, Sfeclă roșie, Canola
Rezistența la insecte
Porumb, bumbac, cartof
rezistența la virusuri
Cartof, Dovleac Galben, Papaya
Îmbunătățirea nutrițională
Orez auriu
Conținut de ulei modificat
Soia, Canola
Maturare întârziată
Roșie

TABLA 1.1

Această transformare agricolă a devenit acum o sursă de controverse. Criticii se tem că utilizarea culturilor rezistente la erbicide va duce la o dependență de controlul chimic al buruienilor și ar putea duce în cele din urmă la apariția unor buruieni rezistente la erbicide. De asemenea, aceștia se tem că trăsăturile plantelor modificate genetic ar putea fi transferate la plantele sălbatice într-un mod care duce la schimbări ireversibile în ecosistem.

Biotehnologia este utilizată și pentru a îmbunătăți valoarea nutritivă a plantelor cultivate. Peste o treime din populația lumii folosește orezul ca aliment de bază, dar majoritatea soiurilor de orez conțin puțină sau deloc vitamina A. Deficitul de vitamina A provoacă anual peste 500.000 de cazuri de orbire infantilă. O tulpină modificată genetic, numită Orezul Auriu, are niveluri ridicate a doi compuși pe care organismul îi transformă în vitamina A. Astfel, Orezul Auriu ar putea reduce prevalența acestei boli. Alte plante, cum ar fi grâul, porumbul, fasolea și maniocul, sunt, de asemenea, modificate pentru a le îmbunătăți valoarea nutritivă prin creșterea conținutului de vitamine și minerale.

Oile și bovinele au fost clonate comercial timp de peste 30 de ani, în principal printr-o metodă numită divizare a embrionilor. În 1996 , oaia Dolly (Figura 1.11) a fost clonată prin transfer nuclear , o metodă în care nucleul unei celule adulte este transferat într-un ou din care nucleul a fost îndepărtat. Acest transfer nuclear face posibilă producerea unui număr mare de urmași cu o gamă de trăsături dorite . Clonarea prin transfer nuclear are numeroase aplicații în agricultură, sport și medicină . Unele trăsături dorite, cum ar fi producția ridicată de lapte la vaci sau viteza la caii de curse, nu apar decât la vârsta adultă; în loc să se împerecheze doi adulți și să se aștepte să se vadă dacă urmașii lor moștenesc caracteristicile dorite, animalele despre care se știe că posedă aceste trăsături pot fi acum produse prin clonare , folosind un adult care are trăsătura dorită. În aplicațiile medicale, cercetătorii au transferat gene umane în animale - numite animale transgenice - care, atunci când ajung la vârsta adultă, produc proteine umane în laptele lor. Prin selectarea și clonarea acestor animale, companiile biofarmaceutice pot produce o turmă cu o rată ridicată și uniformă de producție de proteine . Proteinele umane provenite de la animale transgenice sunt testate în prezent ca tratament farmaceutic pentru boli precum emfizemul. Dacă vor avea succes, aceste proteine vor fi în curând disponibile comercial.

FIGURA 1.11 Dolly, o oaie Finn Dorset clonată din materialul genetic al unei celule mamare adulte. Lângă ea se află Bonnie, prima ei mielușea.

Cine deține organisme modificate genetic?

Odată obținute, pot fi brevetate animalele și plantele transgenice ? Răspunsul este da. Curtea Supremă a SUA a decis în 1980 că organismele vii și genele individuale pot fi brevetate, iar în 1988 o tulpină de șoareci modificați folosind tehnologia ADN-ului recombinant pentru a fi susceptibili la cancer a fost brevetată pentru prima dată (Figura 1.12). De atunci, zeci de plante și animale au fost brevetate . Etica brevetării organismelor vii este o problemă controversată. Cei care susțin brevetarea acestora

FIGURA 1.12 Primul organism modificat genetic brevetat, tulpina de șoareci *One* , modificată genetic pentru a fi susceptibilă la multe tipuri de cancer. Acești șoareci au fost creați pentru a studia dezvoltarea cancerului și pentru a proiecta noi medicamente anticancerigene.

Aceștia susțin că, fără capacitatea de a breveta produsele de cercetare pentru a-și recupera costurile, companiile de biotehnologie nu ar investi în cercetare și dezvoltare la scară largă. De asemenea, susțin că brevetele oferă un stimulent pentru dezvoltarea de noi produse, deoarece companiile ar culege beneficiile asumării riscurilor pentru a aduce noi produse pe piață. Criticii contracarează faptul că brevetarea organismelor, cum ar fi plantele cultivate, va concentra proprietatea producției alimentare în mâinile unui număr mic de companii de biotehnologie, făcând fermierii dependenți economic de semințele și pesticidele produse de aceste companii și reducând diversitatea genetică a plantelor cultivate, deoarece fermierii renunță la soiurile locale care ar putea conține gene importante pentru rezistența la dăunători și boli. Pentru a aborda această problemă și alte probleme ridicate de biotehnologie și aplicațiile sale, vom avea nevoie de o combinație de conștientizare publică, educație, politici sociale solide și legislație atent elaborată.

Biotehnologia în genetică și medicină

Biotehnologia, sub forma testării genetice și a terapiei genice, este deja o parte importantă a medicinei și va fi una dintre forțele fundamentale care vor modela natura practicii medicale în secolul XXI. Peste 10 milioane de copii și adulți din Statele Unite suferă de un anumit tip de tulburare genetică, iar fiecare cuplu care așteaptă un copil are un risc de aproximativ 3% de a avea un copil cu o anumită formă de anomalie genetică. Acum cunoaștem baza moleculară a sute de tulburări genetice (Figura 1.13).

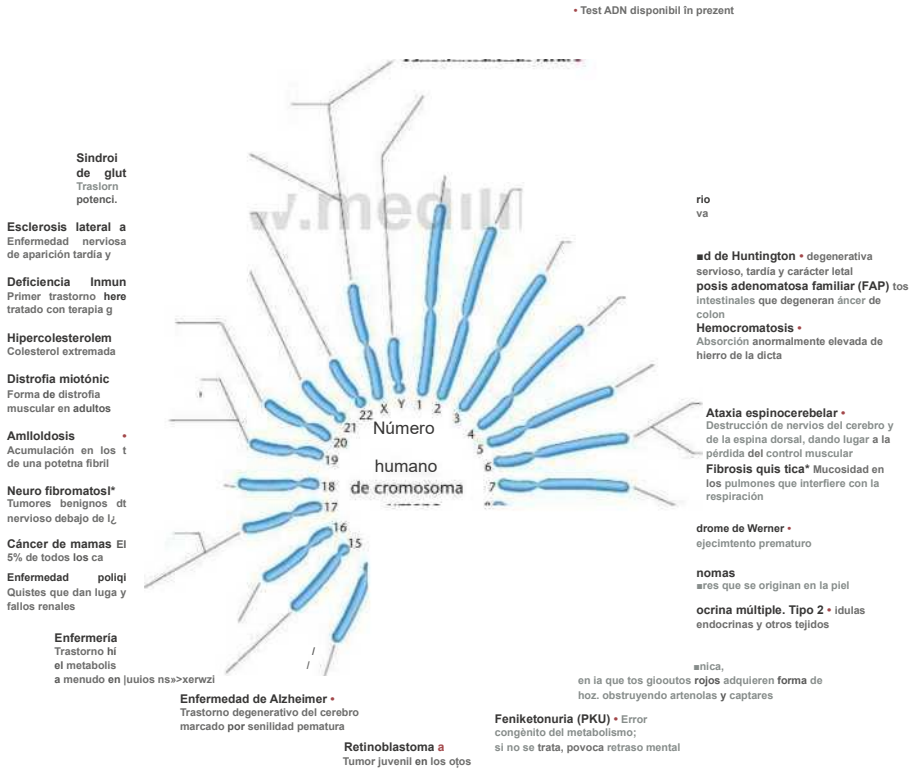

• Test ADN disponibil în prezent
Sindroi de glut Trasiorn potenci.
Esclerosis lateral a Enfermedad nerviosa de aparición tardía y
Deficiencia Inmun Primer trastorno here tratado con terapia g
Hipercolesterolem Colesterol extremada
Distrofia miotónic Forma de distrofia muscular en adultos
Amlloldosis • Acumulación en los t de una potetna fibril
Neuro fibromatosl* Tumores benignos dt nervioso debajo de l¿
Cáncer de mamas El 5% de todos los ca
Enfermedad poliqi Quistes que dan luga y fallos renales
Enfermería Trastorno hi el metabolis a menudo en |uuios ns»>xerwzi
Enfermedad de Alzheimer • Trastorno degenerativo del cerebro marcado por senilidad pematura
Retinoblastoma a Tumor juvenil en los ojos
rio va
■d de Huntington • degenerativa servioso, tardía y carácter letal
posis adenomatosa familiar (FAP) tos intestinales que degeneran áncer de colon
Hemocromatosis • Absorción anormalmente elevada de hierro de la dicta
Ataxia espinocerebelar • Destrucción de nervios del cerebro y de la espina dorsal, dando lugar a la pérdida del control muscular
Fibrosis quis tica* Mucosidad en los pulmones que interfiere con la respiración
drome de Werner • ejecimtento prematuro
nomas ■res que se originan en la piel
ocrina múltiple. Tipo 2 • idulas endocrinas y otros tejidos
■nica, en ia que tos giooutos rojos adquieren forma de hoz. obstruyendo artenolas y captares
Feniketonuria (PKU) • Error congénito del metabolismo; si no se trata, povoca retraso mental
Número humano de cromosoma
X Y 1 2 3 4 5 6 7 16 15 17 18 19 20 21 22

FIGURA 1.13 Reprezentare schematică a complementului cromozomial uman, care arată localizarea unor gene ale căror forme mutante dau naștere la boli ereditare. Afecțiunile care pot fi diagnosticate prin analiza ADN-ului sunt indicate cu un punct roșu.

Genele pentru anemia falciformă, fibroza chistică, hemofilie, distrofie musculară, fenilcetonurie și multe alte tulburări metabolice au fost clonate și sunt utilizate pentru screening-ul prenatal al fetușilor afectați. În plus, acum sunt disponibile teste pentru a informa părinții cu privire la statutul lor de purtători pentru un număr mare de tulburări genetice. Combinația dintre testarea genetică și consilierea genetică oferă cuplurilor informații obiective pe care să își bazeze deciziile cu privire la sarcină. În prezent, sunt disponibile teste genetice pentru sute de boli ereditare, iar acest număr va crește pe măsură ce tot mai multe gene sunt identificate, izolate și clonate. Utilizarea testării genetice și a altor tehnologii, inclusiv a terapiei genice, ridică probleme etice care nu au fost încă rezolvate.

În loc să se testeze câte o genă pe rând pentru a descoperi dacă cineva are o mutație care ar putea cauza o boală la copiii săi, se folosește acum o nouă tehnologie pentru a scana întregul genom și a determina riscul unui individ de a dezvolta o tulburare genetică sau de a avea un copil afectat. Această tehnologie utilizează dispozitive numite micromatrici de ADN sau cipuri ADN (Figura 1.14). Fiecare cip poate conține mii de gene. De fapt, cipuri care conțin toate genele umane sunt disponibile comercial și sunt utilizate pentru a testa expresia genelor în celule.

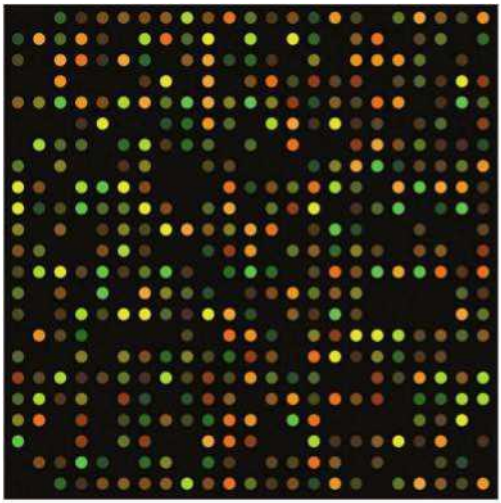


FIGURA 1.14 O porțiune a unui cip AON. Aceste cipuri conțin mii de câmpuri (cercuri) de care sunt atașate molecule de ADN. Montat pe unul dintre aceste cipuri, ADN-ul unui individ poate fi testat pentru copii mutante ale genelor.

bolile canceroase ca un pas către dezvoltarea de terapii adaptate formelor specifice de malignitate. Pe măsură ce tehnologia se - dezvoltă, va fi posibilă utilizarea acestor cipuri pentru a identifica factorii de risc genetici și de mediu care pot declanșa boala.

În terapia genică, medicii transferă gene normale la indivizi afectați de boli genetice. Deși multe încercări de terapie genică păreau inițial încununate de succes, eșecurile tratamentului și decesele pacienților au încetinit dezvoltarea acestei tehnologii . Se așteaptă ca noile metode de transfer genetic să reducă riscurile , iar terapia genică a înregistrat recent mai multe succese.

N / A

Genomica, proteomica și bioinformatica sunt domenii noi și în expansiune

Odată ce bibliotecile genomice au devenit disponibile , oamenii de știință au început să ia în considerare modalități de a citi secvențele de nucleotide ale genomului unui organism . Laboratoare din întreaga lume au inițiat proiecte pentru secvențierea și analizarea genomurilor diferitelor organisme, inclusiv a celor care cauzează boli umane . Până în prezent, au fost secvențiate genomurile a peste 1.000 de organisme , iar peste 5.000 de proiecte suplimentare de secvențiere a genomului sunt în curs de desfășurare .

Proiectul Genomului Uman a început în 1990 ca un efort internațional, sponsorizat de guvern, de secvențiere a genomului uman și a genomurilor a cinci dintre organismele model utilizate în cercetarea genetică (vom discuta importanța organismelor model în secțiunea următoare). La scurt timp după aceea, au fost inițiate alte proiecte genomice sponsorizate de industrie . Primul genom al unui organism liber , o bacterie, a fost secvențiat și publicat în 1995 de către oamenii de știință de la o companie de biotehnologie.

consorțiul public al Proiectului Genomului Uman și un proiect privat de genomică sponsorizat de *Celera Corporation* au publicat prima schiță a secvenței genomului uman, acoperind aproximativ 96% din porțiunea genomului care conține gene. În 2003, secvența codificatoare a genelor rămasă a fost finalizată și publicată . Cele cinci organisme model ale căror genomuri au fost, de asemenea, secvențiate de Proiectul Genomului Uman sunt *Escherichia coli* (bacterii), *Saccharomyces cerevisiae și altele.* (drojdie), *Caenorhabditis elegans* (nematodă), *Drosophila melano gaster* (musca de fructe) și Mus *musculus* (șoarece).

Pe măsură ce proiectele genomice s-au multiplicat și s-au obținut tot mai multe secvențe genomice, au apărut noi discipline biologice . Una dintre acestea, numită

genomică (studiul genomurilor), este dedicată secvențierii genomurilor și studierii structurii , funcției și evoluției genelor și genomurilor. Un al doilea domeniu, proteomica, este un derivat al genomicii . Proteomica identifică setul de proteine prezente într-o celulă într-un set dat de condiții și, în plus, studiază modificarea post-translațională a acestor proteine, poziția lor în celule și interacțiunile dintre proteine care au loc în celulă. Pentru a stoca, extrage și analiza cantitatea masivă de date generate de genomică și proteomică, a fost dezvoltat un subdomeniu specializat al tehnologiei informației , numit bioinformatică, pentru a crea hardware și software pentru procesarea, stocarea și extragerea datelor despre nucleotide și proteine. Dacă luăm în considerare faptul că genomul uman conține peste 3 miliarde de nucleotide, reprezentând aproximativ 20.000 de gene care codifică zeci de mii de proteine, putem înțelege perfect necesitatea utilizării bazelor de date pentru stocarea acestor informații.

Aceste noi domenii schimbă dramatic biologia, care trece de la o știință bazată pe laborator la una care combină experimentele de laborator cu tehnologia informației . Geneticienii și alți biologi folosesc acum informații din bazele de date care conțin secvențe de acid nucleic , secvențe de proteine și rețele de interacțiune genică pentru a răspunde la întrebări experimentale în câteva minute , în loc de luni sau ani. Secțiunea „Explorarea genomicii ” , situată la sfârșitul acestui capitol și al multor altora din carte, vă va oferi oportunitatea de a explora singuri aceste baze de date în timp ce realizați un exercițiu interactiv de genetică .

(a)

(b)

cicluri de viață relativ scurte, iar analiza lor genetică este destul de simplă. De-a lungul timpului, cercetătorii au creat un catalog vast de tulpini mutante ale acestor organisme, iar mutațiile au fost studiate, caracterizate și cartografiate cu atenție. Datorită geneticii lor bine studiate și ușurinței cu care pot fi manipulate experimental, aceste specii au devenit organisme model.

Seria actuală de organisme model în genetică

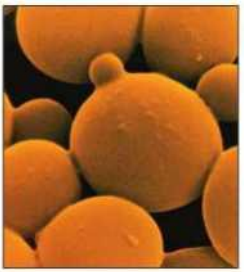
Treptat, geneticienii au adăugat și alte specii la colecția lor de organisme model: virusuri (cum ar fi fagul T și fagul lambda) și microorganisme (bacteria *Escherichia coli* și drojdia *Saccharomyces cerevisiae)* . (Figura 1.16).

FIGURA 1.16 Printre microorganismele care au devenit organisme model pentru studii genetice se numără (a) drojdia *Saccharomyces cerevisiae* și (b) bacteria *Escherichia coli.*

1.7

Studiile genetice se bazează pe utilizarea organismelor model

După redescoperirea lucrărilor lui Mendel în 1900, cercetările genetice efectuate pe un număr mare de organisme au confirmat că principiile moștenirii descrise de acesta erau universal aplicabile animalelor și plantelor. Deși lucrările asupra geneticii multor organisme diferite au continuat , geneticienii și- au concentrat treptat atenția asupra unui număr mic dintre acestea, cum ar fi musca de fructe *(Drosophila melanogaster)* și șoarecele *(Mus musculus).* (Figura 1.15). Această tendință s-a dezvoltat din două motive principale. În primul rând, era clar că mecanismele genetice erau aceleași la majoritatea organismelor și, în al doilea rând, acestea



(a)

(b)

FIGURA 1.15 Prima generație de organisme model în analiza genetică a inclus (a) șoarecele. *Mus musculus* și (b) musculiței de fructe, *Drosophila melanogaster.*

Aceste specii au mai multe caracteristici care le fac deosebit de potrivite pentru cercetarea genetică. Sunt ușor de reprodus, au

Mai recent, au fost dezvoltate specii suplimentare ca organisme model. Nematodul *Caenorhabditis elegans* a fost ales ca sistem model pentru studierea sistemului nervos și a rolului său în comportament , deoarece are un sistem nervos cu doar câteva sute de celule. *Arabidopsis thaliana,* o plantă mică cu un ciclu de viață scurt, a devenit un organism model pentru studierea multor alte aspecte ale biologiei plantelor. Peștele zebră, *Danio rerio,* este folosit pentru a studia dezvoltarea vertebratelor; este mic, se reproduce rapid, iar oul, embrionul și larvele sale sunt transparente.

Organisme model și boli umane

Dezvoltarea tehnologiei ADN-ului recombinant și rezultatele proiectelor de secvențiere a genomului au confirmat faptul că toate formele de viață au o origine comună. Datorită acestei origini comune, genele cu funcții similare în diferite organisme tind să fie similare sau identice în ceea ce privește structura și secvența lor de nucleotide. O mare parte din ceea ce oamenii de știință învață - studiind genetica altor specii poate fi, prin urmare , aplicat la oameni și poate servi drept bază pentru înțelegerea și tratarea bolilor umane. În plus , capacitatea de a transfera gene între specii a permis oamenilor de știință să dezvolte modele de boli umane la organisme, de la bacterii la ciuperci, plante și animale (Tabelul 1.2).

TABELUL 1.2 Organisme model pentru studierea bolilor umane

Corp	Boli umane
E. coli,	cancer de colon și alte tipuri de cancer.
la S. *cerevisiae*	, sindromul Werner.
D. melanogaster	Boli ale sistemului nervos, cancer.
C. *elegans*	Diabet.
D. cardiovasculare	.
M. musculus	Lesch-Nyhan, fibroză chistic, sindromul X fragil și multe alte boli.

Poate părea ciudat să studiezi o boală umană , cum ar fi cancerul de colon, folosind *E. coli,* dar procesele de bază ale reparării ADN-ului (un proces deficitar în unele tipuri de cancer de colon) sunt aceleași în ambele organisme, iar gena implicată *(mutL* în *E. coli* și *MLH1* la oameni) se găsește în ambele. Și mai important, E. *coli* are avantajul de a fi mai ușor de cultivat (celulele se divid la fiecare 20 de minute), astfel încât cercetătorii pot crea și studia cu ușurință noi mutații în gena bacteriană *mutL pentru a încerca să înțeleagă cum* funcționează aceasta. Aceste cunoștințe ar putea duce în cele din urmă la dezvoltarea de medicamente și alte terapii pentru tratarea cancerului de colon la oameni.

Musca de fructe, *D. melanogaster,* este utilizată și pentru studierea anumitor boli umane. La *D. melanogaster* au fost identificate gene mutante care produc fenotipuri cu anomalii ale sistemului nervos, inclusiv anomalii ale structurii creierului, degenerarea sistemului nervos cu debut la vârsta adultă și defecte vizuale, cum ar fi degenerarea retinei . Informațiile din proiectele de secvențiere a genomului indică faptul că aproape toate aceste gene au echivalentele lor la om. De exemplu, genele implicate într-o boală complexă a retinei umane numită retinită pigmentoasă sunt identice cu genele *Drosophila* implicate în degenerarea retinei. Studierea acestor mutații la *Drosophila* ajută la disecția acestei boli complexe și la identificarea funcției genelor implicate.

Pe măsură ce citiți acest text, veți întâlni aceste organisme model în mod repetat. Rețineți, de fiecare dată când le întâlniți, că nu numai că au o istorie bogată în tehnologie și cercetare genetică fundamentală, dar se află și în avangarda studiului bolilor și anomaliilor genetice umane. Cu toate acestea, așa cum se explică în secțiunea următoare , încă nu am ajuns la un consens cu privire la modul și momentul în care această tehnologie poate fi considerată sigură și acceptabilă din punct de vedere etic.

1.8 Trăim în era geneticii

Mendel și-a descris proiectul de zece ani privind moștenirea genetică la plantele de mazăre într -o lucrare din 1865 , prezentată la o reuniune a Societății de Istorie Naturală din Brünn , Moravia. Exact 100 de ani mai târziu, Premiul Nobel din 1965 a fost acordat lui François Jacob , André Lwoff și Jacques Monod pentru munca lor asupra bazelor moleculare ale reglării genelor la bacterii . Această perioadă de timp cuprinde anii care au dus la acceptarea lucrării lui Mendel , descoperirea faptului că genele sunt situate pe cromozomi, experimentele care au demonstrat că ADN-ul codifică informația genetică și determinarea bazei moleculare a replicării ADN-ului. Dezvoltarea rapidă a geneticii, de la grădina mănăstirii a lui Mendel până la Proiectul Genomului Uman și nu numai, este rezumată sub formă de cronologie în Figura 1.17 .

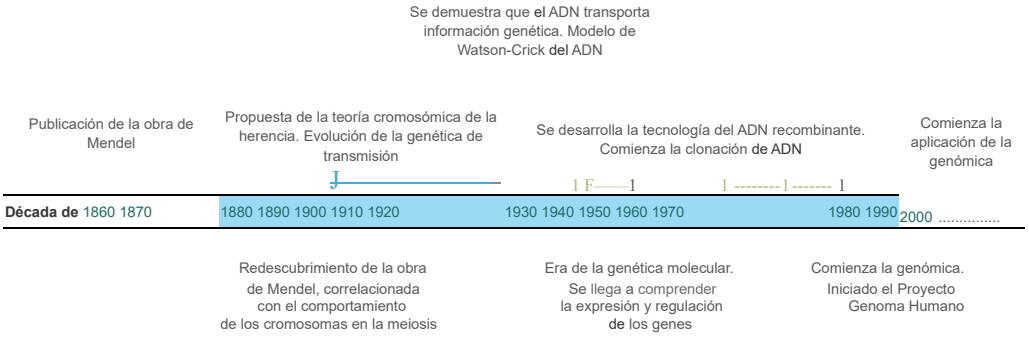

Se demuestra que el ADN transporta información genética. Modelo de Watson-Crick del ADN
Publicación de la obra de Mendel
Propuesta de la teoría cromosómica de la herencia. Evolución de la genética de transmisión
Se desarrolla la tecnología del ADN recombinante. Comienza la clonación de ADN
Comienza la aplicación de la genómica
Década de 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
Redescubrimiento de la obra de Mendel, correlacionada con el comportamiento de los cromosomas en la meiosis
Era de la genética molecular. Se llega a comprender la expresión y regulación de los genes
Comienza la genómica. Iniciado el Proyecto Genoma Humano

FIGURA 1.17 Línea temporal que muestra el desarrollo de la genética, desde los trabajos de Gregor Mendel con plantas de guisante a la actual era de la genómica, con sus numerosas aplicaciones en investigación, medicina y sociedad. El tener una idea de la historia de los descubrimientos en el campo de la genética le proporcionará un marco útil de referencia a medida que progrese en la lectura de este libro.

Premiul Nobel și genetica

Deși și alte discipline științifice s-au extins în ultimii ani, niciuna nu se poate compara cu explozia de informații și entuziasm generată de descoperirile din domeniul geneticii . Nicăieri acest impact nu este mai evident decât în lista Premiilor Nobel legate de genetică, începând cu cele acordate la începutul și mijlocul secolului al XX-lea și continuând până în prezent (vezi coperta interioară). Premiile Nobel în categoriile Medicină sau Fiziologie și Chimie au fost acordate în mod continuu pentru lucrări în genetică și domenii conexe . Primul Premiu Nobel acordat pentru o astfel de muncă a fost acordat lui Thomas Morgan în 1933 pentru cercetările sale asupra teoriei cromozomiale a moștenirii . Acest premiu a fost urmat de multe altele, inclusiv premii pentru descoperirea recombinării genetice, relațiile dintre gene și proteine, structura ADN-ului și codul genetic. În secolul actual, geneticienii continuă să fie recunoscuți pentru influența lor asupra biologiei mileniului actual . Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină din 2002 a fost acordat pentru lucrări privind reglarea genetică a dezvoltării organelor și a morții celulare programate , în timp ce premiul din 2006 a fost acordat pentru descoperirea faptului că moleculele de ARN joacă un rol semnificativ în reglarea expresiei genelor și pentru lucrări privind bazele moleculare ale transcripției la organismele eucariote. Premiul Nobel din 2007 a fost acordat pentru dezvoltarea tehnologiei *de direcționare a* genelor , esențială pentru crearea așa-numiților șoareci *knockout* . care servesc drept modele animale pentru bolile umane, iar în 2009 a fost acordat pentru descoperirea modului în care se replică secvența de ADN care formează telomerii (structurile care protejează capetele cromozomilor).

Genetică și societate

Așa cum nu a existat niciodată o perioadă mai interesantă pentru studiul geneticii, impactul acestei discipline asupra societății nu a fost niciodată mai profund. Genetica și aplicațiile sale în biotehnologie se dezvoltă mult mai rapid decât convențiile sociale, normele publice și legile necesare pentru a reglementa utilizarea sa. Ca societate, ne confruntăm cu numeroase și contradictorii probleme legate de genetică, inclusiv preocupări legate de testarea prenatală, proprietatea asupra genelor, accesul la propriile gene, siguranța terapiei genetice și confidențialitatea genetică. Până la sfârșitul acestui curs, veți fi văzut mai mult decât suficiente dovezi pentru a vă convinge că ne aflăm în Era Geneticii și veți înțelege nevoia de a reflecta asupra științei genetice și a utilizărilor acesteia și de a vă implica în dezbaterea corespunzătoare.

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

>1

Implicațiile științifice și etice ale geneticii moderne

SAU

Una dintre - caracteristicile speciale ale acestui text este seria de eseuri *„Genetică, tehnologie și societate"*, pe care le veți găsi la sfârșitul multor capitole. Aceste eseuri explorează o serie de subiecte legate de genetică care au impact asupra vieților noastre individuale și asupra societății în ansamblu.

Astăzi, genetica afectează fiecare aspect al vieții, provocând schimbări rapide în medicină, agricultură, drept, biotehnologie și industria farmaceutică. Medicii folosesc sute de teste genetice pentru a diagnostica și prezice cursul bolilor și pentru a detecta defecte genetice *in utero*. Oamenii de știință folosesc metode bazate pe ADN pentru a urmări căile evolutive ale multor specii, inclusiv a noastră . Fermierii cultivă plante rezistente la boli și secetă , iar crescătorii de animale cresc animale de fermă mai productive, create prin inginerie genetică. Autoritățile de aplicare a legii și instanțele aplică metode de profilare ADN la testele de paternitate și la investigarea violurilor și crimelor. Industria biotehnologiei generează 700.000 de locuri de muncă și venituri de 50 de miliarde de dolari în fiecare an și își dublează dimensiunea în fiecare deceniu.

Odată cu aceste tehnologii genetice în rapidă evoluție , apar o serie de dileme etice dificile . Cine deține și controlează informațiile genetice ? Sunt plantele și animalele modificate genetic - sigure pentru oameni și mediu? Cum ne putem asigura că tehnologiile genomice sunt disponibile pentru toată lumea, nu doar pentru cei bogați ? Care sunt cele mai probabile consecințe sociale ale noilor tehnologii de reproducere? Acum este momentul în care cu toții trebuie să înțelegem genetica, astfel încât să putem lua decizii personale și societale complexe.

Fiecare eseu *despre Genetică, Tehnologie și Societate* este prezentat într-un nou format interactiv. În secțiunea *„ Rândul tău "* de la sfârșitul fiecărui eseu, veți găsi mai multe întrebări la care să reflectați, împreună cu resurse care vă vor ajuta să explorați fiecare dintre ele. Aceste întrebări sunt concepute pentru a servi ca puncte de plecare pentru cercetări individuale și ca subiecte de explorare în sala de clasă sau într - un cadru de învățare în grup .

Sperăm că eseurile din *Genetică , Tehnologie și Societate* vă vor fi interesante și provocatoare și că vă vor oferi o modalitate eficientă de a începe studiile de genetică modernă. Primul dintre aceste eseuri apare la sfârșitul capitolului 4. Mai jos este o listă a titlurilor eseurilor și a capitolelor în care apar. Lectură plăcută !

- Îmbunătățirea destinului genetic al câinilor de rasă pură Capitolul 4
- De la genele holerei la vaccinurile comestibile Capitolul 6
- O chestiune de gen: Selecția sexului la oameni Capitolul 7
- ADN-ul mitocondrial și misterul Romanovilor Capitolul 9
- Telomeri: Cheia Nemuririi ? Capitolul 11
- de acid nucleic: atacarea mesagerului Capitolul 13
- Sentimentul de colectivitate: rețele sociale în lumea bacteriilor Capitolul 16
- Războiul celulelor stem Capitolul 18
- Proiecte genomice personale și cursa pentru obținerea unui genom pentru 1.000 µs Capitolul 22
- Revoluția Verde Din Nou : Cercetare Genetică cu Rice Capitolul 23
- Urmărind amprentele noastre genetice către Africa Capitolul 25
- Bazine genetice și specii amenințate: situația critică a pumei din Florida Capitolul 26

EXPLORARE
DE GENOMICĂ

Resurse de internet pentru învățarea despre genomică, bioinformatică și proteomică . Domeniul de studiu al IMAGINII : *Explorarea genomică*

Genomica este una dintre - disciplinele genetice care se schimbă cel mai rapid. Pe măsură ce informații noi se acumulează în acest domeniu într-un ritm uimitor, a ține pasul cu evoluțiile actuale din genomică, proteomică, bioinformatică și alte domenii ale geneticii moderne reprezintă o provocare semnificativă. Prin urmare, geneticienii, biologii moleculari și alți oameni de știință se bazează pe baze de date online pentru a partaja și compara informații noi.

Scopul secțiunilor *„Explorarea genomicii”*, care apar la sfârșitul multor capitole, este de a introduce diverse baze de date de pe internet pe care oamenii de știință din întreaga lume le utilizează pentru a partaja, analiza, organiza, compara și stoca date din studii în genomică, proteomică și domenii conexe. Vom explora această sursă incredibilă de informații noi - care cuprinde unele dintre cele mai bune resurse publice din lume - și vom arăta cum se utilizează tehnicile bioinformatice pentru a analiza datele secvențiale și structurale găsite acolo. Fiecare set de exerciții *„Explorarea genomicii ”* va oferi o - introducere de bază într-una sau mai multe baze de date sau programe utile sau deosebit de relevante, apoi va ghida cititorul prin exerciții care utilizează aceste baze de date pentru a extinde sau consolida concepte importante explicate în capitol. Exercițiile sunt concepute pentru a vă ajuta să navigați în bazele de date, dar explorările dvs. nu trebuie să se limiteze la aceste experiențe. O parte din distracția învățării genomicii constă în explorarea acestor baze de date extraordinare pe cont propriu pentru a obține cele mai recente informații despre orice subiect care vă interesează . Bucurați-vă de explorări!

În acest capitol, am discutat importanța organismelor model atât pentru tehnicile experimentale clasice, cât și pentru cele moderne din domeniul geneticii . În prima noastră serie de exerciții *de explorare genomică* , vom prezenta câteva site-uri web care reprezintă resurse excelente pentru găsirea de informații actualizate despre o gamă largă de proiecte genomice finalizate sau în curs de desfășurare care implică organisme model.

■ Exercițiul I. Genome News Network Din 1995, când oamenii de știință au descifrat genomul Haemophilus *influenzae* , făcând din această bacterie primul organism al cărui genom a fost complet secvențiat, au fost completate secvențele a peste 500 de organisme . Genome News Network este un site web care oferă acces la informații de bază despre secvențele genomului finalizate recent.

1. Vizitați site-ul web al Genome News Network la adresa www.genomenewsnetwork.org .
2. Faceți clic pe linkul *Ghid rapid pentru genomurile secvențiate*. Derulați în josul paginii , faceți clic pe linkurile corespunzătoare pentru a accesa informații - despre genomurile Anopheles gambiae , Lactococcus *lactis* și *Pan troglodytes* și răspundeți la următoarele întrebări pentru fiecare organism:

   a) Cine a secvențiat genomul acestui organism și în ce an a fost finalizată secvențierea?
   b) Care este dimensiunea genomului fiecărui organism în perechi de baze?
   c) Aproximativ câte gene sunt în fiecare genom?
   d) Descrieți pe scurt de ce geneticienii sunt interesați de studierea genomului acestui organism .

■ Exercițiul II. Explorarea genomurilor organismelor model

O cantitate vastă de informații este disponibilă despre genomurile numeroaselor organisme model care au jucat un rol neprețuit în avansarea înțelegerii noastre asupra geneticii. Mai jos sunt linkuri către diverse site-uri web care sunt resurse excelente pentru studierea geneticii . Vizitați aceste site-uri pentru a găsi linkuri către informații despre organismul model preferat și pentru a afla mai multe despre genomul său.

- Ensembl Genome Browser: www.ensembl.org/index.html . Un site excelent pentru obținerea de informații despre genomul multor organisme model.
- FlyBase: f1ybase.org. O bază de date imensă despre *genomurile și genele Drosophila.*
- Baza de date online Gold™ Genomes: www.genomesonline.org . Un acces destul de cuprinzător la proiecte genomice finalizate și în curs de desfășurare la nivel mondial.
- Organisme model pentru cercetare biomedicală: www.nih.gov/science/models . Site-ul web al Institutului Național de Sănătate din SUA, cu o colecție cuprinzătoare de resurse despre organismele model.
- Genomică funcțională științifică: www.sciencemag.org/feature/plus/sfg. Gestionată de revista *Science,* aceasta este o resursă bună pentru obținerea de informații despre genomurile organismelor model și alte domenii actuale ale genomicii.
- Resursa de informații despre Arabidopsis: www.arabidopsis.org . Baza de date genetică pentru planta model *Arabi dopsis thaï ia na.*
- Worm Base: www.wormbase.org . Bază de date genomică pentru nematodul *Caenorhabditis elegans.*

Puncte de rezumat

1. Munca lui Mendel asupra plantelor de mazăre a stabilit principiile transmiterii genelor de la părinți la urmași, pe care se bazează fundamentele geneticii.
2. Genele și cromozomii sunt unitățile fundamentale în teoria cromozomială a moștenirii genetice. Această teorie explică faptul că trăsăturile ereditare sunt controlate de gene situate pe cromozomi și arată cum transmiterea informațiilor genetice menține continuitatea genetică de la o generație la alta.
3. Genetica moleculară — bazată pe dogma centrală conform căreia ADN-ul este un șablon pentru fabricarea ARN-ului, care la rândul său codifică ordinea aminoacizilor din proteine — explică fenomenele descrise de genetica mendeliană, numită genetică a transmisiei.
4. Tehnologia ADN-ului recombinant, o metodologie de amploare utilizată în genetica moleculară, permite fragmentarea genelor unui organism, introducerea lor în vectori și donarea lor, producând copii multiple ale unor secvențe specifice de ADN.
5. Biotehnologia a revoluționat agricultura, industria farmaceutică și medicina. A făcut posibilă producția în

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

Testarea genetică permite detectarea persoanelor cu anomalii genetice și a celor cu risc de a avea copii afectați , în timp ce terapia genică oferă speranță pentru tratarea anomaliilor genetice grave.

6. Genomica, proteomica și bioinformatica sunt domenii noi derivate din tehnologia ADN-ului recombinant . Aceste domenii combină genetica cu tehnologia informației și permit oamenilor de știință să exploreze secvențele genomice , structura și funcția genelor , gama de proteine din celule și evoluția genomului. Proiectul Genomului Uman este un exemplu de genomică.
7. Utilizarea organismelor model ne -a permis să avansăm în înțelegerea mecanismelor genetice și, împreună cu tehnologia ADN-ului recombinant , a făcut posibilă dezvoltarea de modele ale bolilor genetice umane .
8. Efectele tehnologiei genetice asupra societății sunt foarte profunde, iar dezvoltarea standardelor și a legislației pentru a aborda problemele care decurg din utilizarea acestei tehnologii este în urma inovațiilor rezultate.

Problemas y preguntas para la discusión

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

1. Descrieți concluziile lui Mendel despre modul în care trăsăturile sunt transmise din generație în generație.
2. Ce este teoria cromozomială a moștenirii genetice și cum se leagă aceasta de descoperirile lui Mendel?
3. Definiți genotipul și fenotipul și indicați cum se leagă cele două concepte .
4. Ce sunt alelele? Este posibil să existe mai mult de două alele pe un cromozom ? aceeași genă?
5. Comparați cromozomii și genele.
6. Cum este codificată informația genetică într -o moleculă de ADN ?
7. Descrieți dogma centrală a geneticii moleculare și indicați modul în care aceasta servește drept bază pentru genetica modernă.
8. Câte proteine diferite, fiecare compusă din cinci aminoacizi, pot fi construite folosind cei 20 de aminoacizi diferiți care se găsesc în proteine ?
9. Rezumați rolul jucat de enzimele de restricție și vectori în clonarea ADN-ului.
10. Ce impact a avut biotehnologia asupra agriculturii în Statele Unite?
11. Micromatricile de ADN sau cipurile ADN sunt instrumente de diagnostic disponibile comercial , utilizate pentru testarea expresiei genelor . Cum pot fi aplicate astfel de cipuri în medicina umană?
12. În ce sens este disciplina numită genomică similară cu proteomica ? Prin ce diferă ? Ce înțelegem prin termenul bioinformatică?
13. Rezumați argumentele pro și contra brevetării organismelor modificate genetic .
14. Genomul nostru conține între 20.000 și 25.000 de gene. Până în prezent , au fost acordate brevete pentru peste 6.000 dintre aceste gene. Credeți că firmele sau persoanele fizice ar trebui să poată breveta gene umane? De ce sau de ce nu?
15. În ce sens au avansat organismele model cunoștințele noastre despre genele care controlează anumite boli umane ?

Si supiera de la existencia de una enfermedad hereditaria de efectos desastrosos y aparición tardía en su familia, imposible de tratar (en otras palabras, una enfermedad que no aparece hasta una etapa tardía de la vida) y pudiera comprobar si es usted portador de la misma a la edad de 20 años, ¿desearía saber si va a desarrollar esa enfermedad? ¿Cambiaría su respuesta al llegar a los 40 años?

17. La Era de la Genética nació por los notables avances en el uso de la biotecnología a la hora de manipular genomas de plantas y animales. Dado que la población mundial ha llegado a los 6000 millones y se espera que alcance los 9.200 millones en el año 2050, algunos científicos han propuesto que solo la introducción a nivel mundial de alimentos modificados genéticamente permitirá incrementar las cosechas lo suficiente como para satisfacer las futuras demandas nutricionales. La resistencia a los pesticidas, a los herbicidas, al frío, a la sequía y a la salinidad, junto con un valor nutricional incrementado, se ven como atributos positivos de los alimentos modificados genéticamente. Sin embargo, otras personas advierten del daño no intencionado a otros organismos, de la reducción en la efectividad de los pesticidas, de la transferencia génica a otras especies, de la alergenicidad y de efectos aún desconocidos sobre la salud del ser humano, como problemas potenciales de los alimentos genéticamente modificados. Si dependiera de usted controlar la introducción de un alimento de primera necesidad genéticamente modificado (arroz, por ejemplo), ¿qué criterios establecería antes de permitir esa introducción? La reunión de BIO (Biotechnology Industry Organization) celebrada en Filadelfia en junio de 2005 permitió juntar a líderes de todo el mundo de las industrias biotecnológica y farmacéutica. Simultáneamente, BioDemocracy 2005, un grupo compuesto por personas que intentan señalar los peligros derivados de la aplicación a gran escala de la biotecnología también se reunió en Filadelfia. Los beneficios de la biotecnología están esbozados en el texto. Trate de predecir algunos de los riesgos que sin duda alguna se analizaron en la reunión de BioDemocracy.

Cromosomas en el estadio de prometafase de la mitosis, de una célula de la flor de *Haemanthus*.

2

Mitoză și meioză

CONCEPTE CAPITOL

►► Continuitatea genetică între generațiile de celule și între generațiile de organisme din orice specie cu reproducere sexuată este menținută datorită proceselor de mitoză , respectiv meioză .

►► Celulele eucariote diploide își au informația genetică în perechi de cromozomi omologi, un membru al fiecărei perechi fiind derivat de la tată, iar celălalt de la mamă.

►► Mitoza oferă un mecanism de distribuire a cromozomilor duplicați între celulele fiice în timpul reproducerii celulare.

►► Mitoza transformă o celulă diploidă în două celule fiice diploide.

►► Procesul meiozei distribuie câte un membru al fiecărei perechi de cromozomi omologi în fiecare gamet sau spor, reducând astfel numărul de cromozomi diploizi la numărul de cromozomi haploizi .

►► Meioza dă naștere variabilității genetice prin distribuirea către gameți sau spori a diferitelor combinații de cromozomi paterni și materni din

fiecare pereche de cromozomi omologi.

►> În timpul fazelor de mitoză și meioză, materialul genetic se condensează , formând structuri discrete numite cromozomi.

lire sterline

În fiecare ființă vie există o substanță numită material genetic. Cu excepția anumitor virusuri, acest material este compus din acidul nucleic ADN. ADN-ul are o structură liniară subiacentă care conține segmente numite gene, ale căror produse direcționează activitățile metabolice ale celulelor. ADN-ul unui organism, cu gama sa de gene, este organizat în structuri numite cromozomi , care servesc drept vehicul pentru transmiterea informațiilor genetice. Modul în care cromozomii sunt transmiși de la o generație celulară la alta și de la organisme la urmașii lor trebuie să fie extraordinar de precis. În acest capitol, vom analiza exact cum se menține continuitatea genetică între celule și organisme.

Există două procese implicate în continuitatea genetică a celulelor nucleate: mitoza și meioza. Deși mecanismul ambelor procese este similar în multe privințe, rezultatele sunt complet diferite. Mitoza duce la producerea a două celule, fiecare cu același număr de cromozomi ca și celula - mamă. În schimb, meioza reduce cantitatea de material genetic și numărul de cromozomi la exact jumătate. Această reducere este esențială pentru ca reproducerea sexuată să aibă loc fără a duplica cantitatea de material genetic în fiecare nouă generație. Strict vorbind, mitoza este perioada ciclului celular în care componentele ereditare sunt împărțite în mod egal între celulele fiice. Meioza este un tip special de diviziune celulară care are ca rezultat producerea de celule sexuale : gameți sau spori . Acest proces este o etapă esențială în transmiterea informațiilor genetice de la un organism la urmașii săi.

În mod normal, cromozomii sunt vizibili doar în timpul mitozei și meiozei. Când celulele nu se divid , materialul genetic care alcătuiește cromozomii se desfășoară și se decondensează, rezultând o rețea difuză în nucleu , numită în general cromatină . Înainte de a descrie mitoza și meioza, vom trece pe scurt în revistă structura - celulară , subliniind componentele care sunt deosebit de importante pentru funcția genetică. De asemenea, vom compara diferențele structurale dintre celulele procariote (nenucleate) ale bacteriilor și celulele eucariote ale organismelor superioare. Restul acestui capitol va fi dedicat comportamentului cromozomilor în timpul diviziunii celulare .

HEI

Structura celulei este strâns legată de funcția genetică

Înainte de 1940, cunoștințele noastre despre structura celulară se limitau la informațiile obținute cu microscopul optic. În jurul anului 1940, microscopul electronic se afla în stadiile incipiente de dezvoltare, iar până în 1950, puteau fi dezvăluite multe detalii ultrastructurale ale celulei . Microscopul electronic a arătat că celulele sunt structuri extrem de variabile și foarte organizate, a căror formă și funcție depind de expresia genetică specifică realizată de fiecare tip de celulă . A apărut o nouă lume de membrane răsucite, organite, microtubuli, granule și filamente. Aceste descoperiri au revoluționat gândirea în întregul domeniu al biologiei . Multe componente celulare , cum ar fi nucleolii, ribozomii și centriolii, sunt implicate direct sau indirect în procesele genetice. Alte componente, cum ar fi mitocondriile și glandele tiroide, conțin propriile informații genetice distinctive . Aici , ne vom concentra în principal asupra acelor aspecte ale structurii celulare legate de studiul genetic. Figura 2.1 prezintă o celulă animală tipică , cu multe dintre structurile pe care le vom discuta.

Toate celulele sunt înconjurate de o membrană plasmatică, un înveliș exterior care definește limitele celulei și o separă de mediul său extern imediat. Nu este o membrană pasivă; mai degrabă, reglează activ trecerea substanțelor în și din celulă . Pe lângă această membrană, celulele vegetale au un înveliș exterior numit perete celular, a cărui componentă principală este un polizaharid numit *celuloză.*

Multe , dacă nu majoritatea, celulelor animale au un înveliș deasupra membranei plasmatice numit glicocalix sau înveliș celular. Compus din glicoproteine și polizaharide, acest înveliș are o compoziție chimică diferită de structurile comparabile din plante sau bacterii. Glicocalixul, printre alte funcții, oferă identitate biochimică suprafeței celulare, iar componentele învelișului care stabilesc identitatea celulară sunt sub control genetic. De exemplu, mai mulți markeri de identitate de care ați auzit - antigenele AB, Rh și MN - se găsesc pe suprafața globulelor roșii , printre alte tipuri de celule. Antigenele de histocompatibilitate, care induc un răspuns imun în transplanturile de țesuturi și organe, sunt prezente pe suprafața altor celule . În plus, o serie de molecule receptor pot fi găsite și pe suprafața celulei . Aceste molecule acționează ca situsuri de recunoaștere care transferă semnale chimice specifice prin - membrana celulară în celulă .

Organismele vii sunt clasificate în două grupe principale , în funcție de prezența sau nu a nucleului în celulele lor . Prezența nucleului și a altor organite

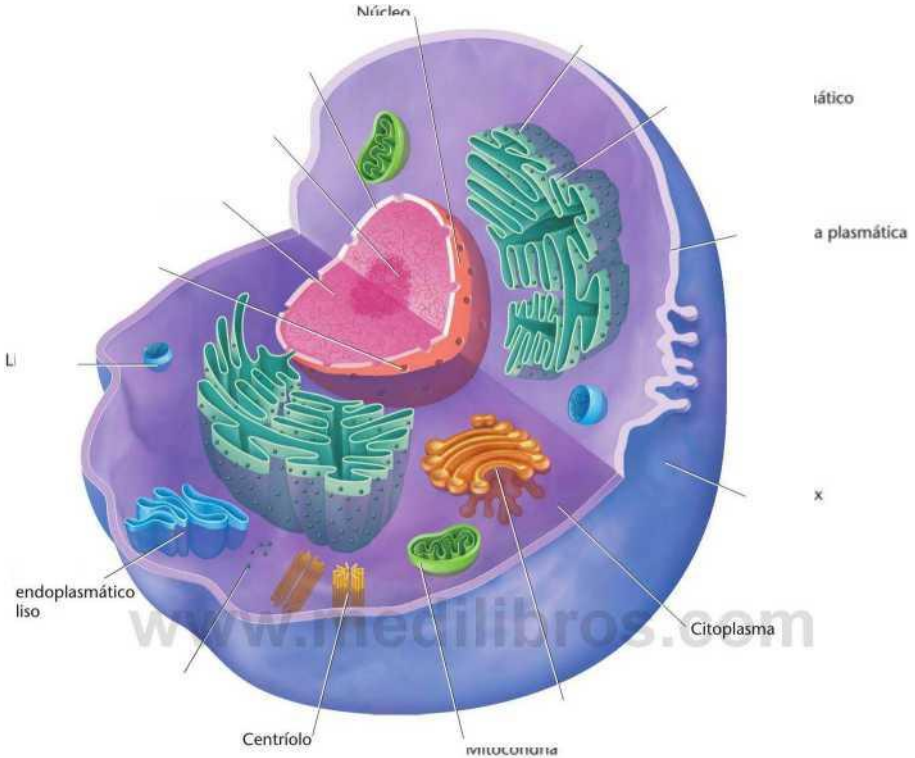


FIGURA 2.1 Esquema de una célula animal típica. Se destacan los componentes celulares presentados en el texto.

Structurile membranoase sunt caracteristica definitorie a organismelor eucariote . Nucleul celulelor eucariote este o structură legată de membrană care găzduiește materialul genetic, ADN-ul, asociat cu un număr mare de proteine acide și bazice , aranjate în fibre subțiri. În perioadele ciclului celular când nu există diviziune, aceste fibre sunt dispersate și se desfășoară, formând cromatina (așa cum s-a menționat anterior). În timpul mitozei și meiozei, fibrele de cromatină se încolăcesc și se condensează pentru a forma cromozomi. Nucleul conține, de asemenea, nucleolul , o componentă amorfă în care se sintetizează ARN-ul ribozomal și unde au loc etapele inițiale ale asamblării ribozomilor. Regiunile de ADN care codifică ARN-ul ribozomal (ARNr) sunt denumite colectiv regiunea organizatoare nucleolară sau NOR.

Organismele procariote, dintre care există două grupuri principale, nu au înveliș nuclear și organite legate de membrană . În scopul analizei noastre, ne vom concentra pe eubacterii; celălalt grup cuprinde bacterii mai vechi numite archaea . În *eubacterii* , cum ar fi Escherichia *coli* , Materialul genetic este prezent sub forma unei molecule de ADN lungi, circulare, compactate într-o zonă fără înveliș, numită nucleoid . O parte din ADN poate fi atașată de membrana celulară , dar, în general, nucleoidul ocupă o suprafață mare a celulei . Deși ADN-ul este compactat, acesta nu suferă înfășurarea extinsă caracteristică etapelor mitotice, care este momentul în care cromozomii organismelor eucariote devin vizibili . Nici ADN-ul acestor organisme nu este la fel de asociat cu proteinele ca ADN -ul organismelor eucariote. Figura 2.2 prezintă formarea a două bacterii prin diviziune celulară , ilustrând regiunile nucleoide care adăpostesc cromozomii bacterieni . Celulele procariote nu au un nucleol diferențiat, dar conțin gene care codifică molecule de ARNr .

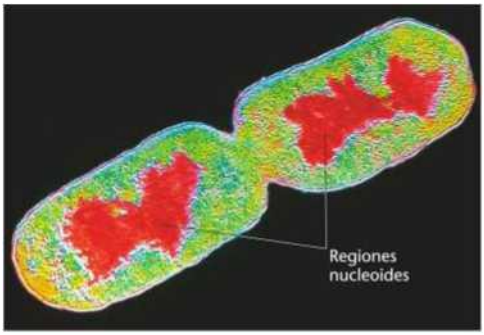


FIGURA 2.2 Micrografie electronică cu amplificare de culoare a E. *coli* în timpul diviziunii celulare. Deosebit de vizibile sunt cele două zone cromozomiale (prezentate în roșu) numite nucleoizi, care au fost divizate între cele două celule fiice.

Excluzând nucleul, restul celulei eucariote care rămâne înconjurat de membrana plasmatică se numește **citoplasmă** și include diverse organite celulare extranucleare . În citoplasmă, o substanță coloidală fără particule numită **citosol** înconjoară și închide organitele celulare. Citoplasma include, de asemenea, un sistem extins de tubuli și filamente care formează citoscheletul, care oferă o rețea de structuri de susținere în interiorul celulei. Compusă în principal din microtubuli, care sunt formați din proteina **tubulină**, și **microfilamente**, care sunt derivate din proteina **actină**, această - structură menține forma celulei, facilitează motilitatea celulară și susține diversele organite.

Unul dintre **organite** , reticulul **endoplasmatic membranos (RE)**, compartimentează citoplasma, mărind considerabil suprafața disponibilă pentru sinteza **biochimică** . RE poate **fi** neted, caz în care servește drept loc pentru sinteza acizilor grași și fosfolipidelor, sau rugos, numit așa deoarece în interiorul său se găsesc ribozomi. **Ribozomii** sunt locurile pentru traducerea informațiilor genetice, **care** se găsesc în ARN-ul mesager (ARNm), în proteine.

Pentru activitatea celulei eucariote, există alte trei structuri citoplasmatice foarte importante: mitocondriile, cloroplastele și centriolii. **Mitocondriile** se găsesc în majoritatea organismelor eucariote, inclusiv atât celulele animale, cât și cele vegetale, și sunt locurile fazelor oxidative ale respirației celulare. Aceste reacții chimice generează cantități mari de adenozin trifosfat (ATP), o moleculă bogată în energie. **Cloroplastele se** găsesc în plantele superioare, alge și unele protozoare. Aceste organite sunt asociate cu fotosinteza, principalul proces de captare a energiei de pe planeta noastră. Atât **mitocondriile** , cât și cloroplastele au **un** tip de ADN distinct de cel găsit în nucleu. În plus, aceste organite se pot autoreplica, transcrie și traduce informațiile lor genetice. Este - interesant de observat **că** mecanismul genetic al mitocondriilor și cloroplastelor este foarte similar cu **cel** al celulelor procariote . Aceste observații, precum și altele, au condus **la** propunerea că aceste organite au fost odată organisme primitive , cu viață **liberă** , care au stabilit relații simbiotice cu o celulă eucariotă primitivă . Această teorie, care **se referă** la originea evolutivă **a** acestor organite, **se** numește **ipoteza endosimbiotică**.

Celulele animale și unele celule vegetale au, de asemenea, o pereche de structuri complexe numite **centrioli**. Acești **corpi** citoplasmatici , situați într -o regiune specializată numită **centrosom**, sunt asociați cu organizarea **fibrelor fusului de acțiune** , care joacă un rol în mitoză **și** meioză . La **unele** organisme , centriolul derivă **dintr** -o altă structură, corpul bazal, **care** este asociat cu formarea **ciliilor și flagelilor (** structuri asemănătoare filamentelor și biciului care propulsează celulele **sau** materialele mobile). De ani de zile , numeroase publicații au sugerat că centriolii și corpii bazali **conțin** ADN , care ar fi implicat în replicarea acestor structuri. Această idee este încă investigată.

Organizarea **fibrelor fusului** de **nucleotidă** de către centrozomi are loc în stadiile incipiente ale mitozei și meiozei. Aceste fibre joacă **un** rol crucial în mișcarea cromozomilor în timpul diviziunii celulare . Sunt compuse din fascicule de microtubuli, formați **din** polimeri ai proteinei tubuline.

2.2 În organismele diploide, cromozomii formează perechi omoloage

Atunci când discutăm despre procesele de mitoză și meioză, este important să înțelegem conceptul de cromozomi omologi. Această înțelegere va fi, de asemenea, crucială atunci când discutăm despre genetica mendeliană. Cromozomii sunt cel mai ușor de vizualizat în timpul mitozei. La o examinare atentă , se observă că au o dimensiune **și** o formă caracteristice . Fiecare cromozom **are** o regiune condensată sau constricționată numită **centromer** , **care** conferă fiecărui cromozom aspectul său general. Figura 2.3 ilustrează cromozomi cu centromeri situați în diferite poziții de-a lungul **lungimii lor** . Brațele cromozomilor se extind de o parte și de alta a **centromerului** . În funcție de poziția centromerului, brațele variază în lungime .

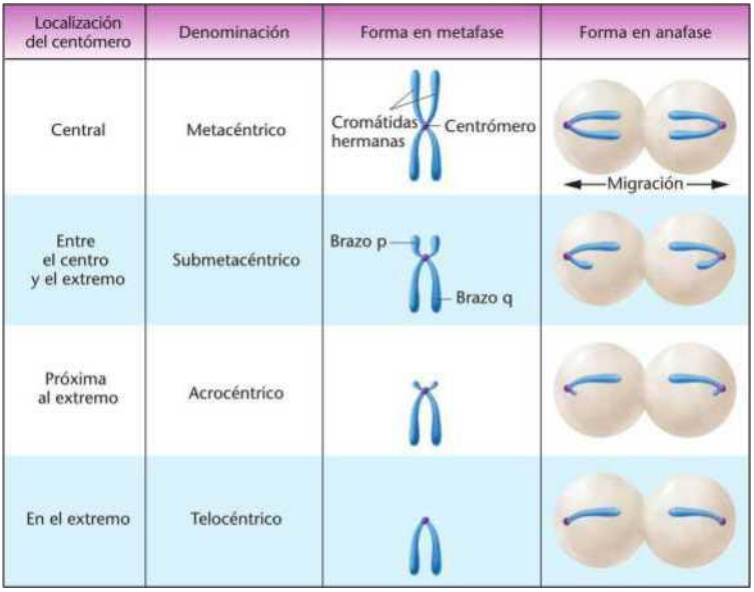


FIGURA 2.3 Poziţiile centromerului şi denumirile cromozomilor pe baza acestor poziţii. Reţineţi că forma cromozomului în anafază este determinată de poziţia centromerului în timpul metafazei.

diferenţe relative. După cum se arată în Figura 2.3, cromozomii sunt clasificaţi ca metacentrici, submetacentrici, acrocentrici sau telocentrici în funcţie de locaţia centromerului. Prin convenţie, braţul mai scurt este prezentat deasupra centromerului şi se numeşte braţul p (p de la „mic"). Braţul mai lung este prezentat mai jos şi se numeşte braţul q (deoarece q este următoarea literă a alfabetului).

Studiind mitoza, putem face şi alte observaţii importante. În primul rând, toate celulele somatice ale indivizilor din aceeaşi specie au acelaşi număr de cromozomi . În majoritatea cazurilor, acesta reprezintă numărul diploid (2n). Atunci când se examinează lungimile şi poziţiile centromerelor acestor cromozomi , apare o a doua caracteristică generală. Cu excepţia cromozomilor sexuali, cromozomii se găsesc în perechi în ceea ce priveşte aceste două proprietăţi, iar membrii fiecărei perechi sunt numiţi cromozomi omologi. Astfel, pentru fiecare cromozom cu o lungime şi o poziţie specifică a centromerului, există un alt cromozom cu caracteristici identice.

Desigur, există excepţii de la această regulă. Multe bacterii şi virusuri au un singur cromozom, iar unele organisme, cum ar fi drojdiile şi mucegaiurile, şi anumite plante, cum ar fi briofitele (muşchii), îşi petrec faza predominantă a ciclului lor de viaţă într-o stare haploidă. Adică, conţin doar un membru al fiecărei perechi de cromozomi omologi pentru cea mai mare parte a ciclului lor .

Figura 2.4 prezintă aspectul fizic al diferitelor perechi de cromozomi omologi . În această figură, cromozomii mitotici umani au fost fotografiaţi, decupaţi şi împerecheaţi pentru a forma un cariotip. După cum se poate observa, specia umană are un număr de cromozomi *de 2n* . Dintre cei 46 de cromozomi , la o examinare mai atentă, se observă o mare diversitate în ceea ce priveşte dimensiunea şi poziţia centromerului. De asemenea , trebuie remarcat faptul că

fiecare dintre cei 46 de cromozomi are în mod clar o structură dublă, cu două *cromatide surori* . în paralel, uniți printr -un singur centromer. Dacă acestor cromozomi li s-ar permite să continue diviziunea, fiecare pereche de cromatide surori, care sunt identice între ele, s-ar separa în două celule noi pe măsură ce diviziunea continua .

Numărul haploid (n) de cromozomi este egal cu jumătate din numărul diploid. Setul complet de gene conținute într - un set - haploid de cromozomi constituie genomul speciei . Acesta include, desigur , copii ale tuturor genelor, precum și o cantitate mare de ADN necodificator . Exemplele enumerate în Tabelul 2.1 demonstrează că o gamă largă de valori pentru n se găsește la animale și plante .

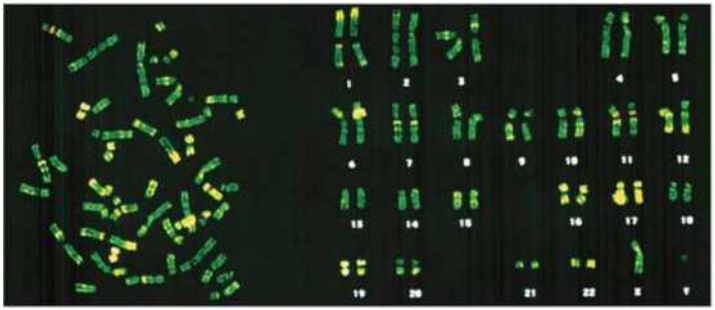


FIGURA 2.4 Prepararea în metafază a cromozomilor dintr-o celulă în diviziune a unui mascul (stânga) și cariotipul derivat din acesta (dreapta). Toți cromozomii, cu excepția X și Y, se găsesc în perechi omoloage. Fiecare cromozom este de fapt o structură dublă, formată dintr-o pereche de cromatide surori unite printr-un centromer comun.

TABLA 2.1

Numărul haploid de cromozomi ai diferitelor organisme

Denumire comună	Denumire științifică	Număr haploid
Alge verzi	*Chlamydomonas reinhardtii*	18
Bumbac	*Gossypium hirsutum*	26
Arabidopsis	*Arabidopsis thaliana*	5
Păsări de curte	*Gallus domesticus*	39
Snapdragon	*Antirrhinum majus*	8
Cal	*Equus caballus*	32
Ceapă de grădină	*Allium cepa*	8
Cimpanzeu	*Pan troglodytes*	24
Stramonium	*Datura stramonium*	12
Bovine	*Bos taurus*	30
Pisică	*Felis domestica*	19
Mazăre de grădină	*Pisum sativum*	7
Fasole	*Vicia faba*	6
Uman	*Homo sapiens*	23
Drojdie	*Saccharomyces cerevisiae*	16
Porumb	*Zea mays*	10
Fluture de mătase	*Bombyx mori*	28
Mucegai de mâzgă	*Dictyostelium discoideum*	7
Mucegai negru pe pâine	*Aspergillus nidulans*	8
Mucegai roz pentru	*Neurospora crassa*	7
maimuță rhesus	*Macaca mulat*	21
Musca de fructe	*Drosophila melanogaster*	4
Muscă de casă	*Musca domestică*	6
Țânțar	*Culex pipiens*	3
Nematodo	*Caenorhabditis elegans*	6
Nenúfar alb	*Nymphaea alba*	80
Onagra	*Oenothera biennis*	7
Cartofi	*Solanum tuberosum*	24
Câine	*Câine familiar*	39
Pește cebră	*Danio Rerio*	25
Rană	*Rana pipiens*	13
Ratón	*Mus musculus*	20
Saltamontes	*Melanoplus differentialis*	12
Tabac	*Nicotiana tabacum*	24
Roșie	*Lycopersicon esculentum*	12
Grâu	*Triticum aestivum*	21

de ani

Perechile de cromozomi omologi au o similaritate genetică semnificativă. Au gene identice, situate în aceeași poziție de-a lungul cromozomului , numite locus (plural , loci) . Prin urmare , sunt identice în ceea ce privește trăsăturile pe care le influențează și potențialul lor genetic . La organismele care se reproduc sexuat, un membru al fiecărei perechi provine de la mamă (prin ovul), iar celălalt de la tată (prin spermatozoid). Prin urmare , ca o consecință a moștenirii biparentale, fiecare organism diploid are două copii ale fiecărei gene. După cum vom vedea în capitolele despre genetica transmiterii , membrii fiecărei perechi de gene , deși influențează aceeași trăsătură, nu sunt neapărat identici . Într-o populație de indivizi din aceeași specie , pot exista multe forme alternative ale aceleiași gene, numite alele .

Conceptele de număr haploid, număr diploid și cromozomi omologi sunt importante pentru înțelegerea meiozei. În timpul formării gameților sau sporilor , meioza reduce numărul diploid de cromozomi la numărul haploid. Prin urmare , gameții haploizi sau sporii au exact un membru din fiecare pereche de cromozomi - adică un set haploid complet . După fuziunea celor doi gameți în fertilizare , numărul diploid este restabilit ; adică zigotul are două seturi haploide complete de cromozomi . În acest fel , constanța materialului genetic este menținută de la o generație la alta.

o excepție importantă de la conceptul de perechi de cromozomi omologi . La multe specii, membrii unei perechi - cromozomii care determină sexul - nu au de obicei aceeași dimensiune, poziție a centromerilor , raport între brațe sau conținut genetic. De exemplu, la oameni

, femelele au doi cromozomi X omologi, în timp ce masculii au un cromozom X și un cromozom Y (Figura 2.4). Cromozomii X și Y nu sunt strict omologi. Cromozomul Y este considerabil mai mic și îi lipsesc majoritatea loci-urilor găsite pe cromozomul X. Cu toate acestea, aceștia conțin regiuni omoloage și se comportă ca omologi în timpul meiozei, astfel încât gameții produși de masculi primesc fie un cromozom X, fie un cromozom Y.

23 de ani

Mitoza distribuie cromozomii între celulele fiice.

Mitoza este fundamentală pentru toate organismele eucariote. La unele organisme unicelulare, cum ar fi protozoarele și unele ciuperci și alge, mitoza (ca parte a diviziunii celulare) oferă baza reproducerii lor asexuate. Organismele multicelulare diploide își încep ciclul de viață ca ouă unicelulare fertilizate numite zigoți . Activitatea mitotică a zigotului și a celulelor fiice ulterioare este baza creșterii și dezvoltării organismului . La organismele adulte, activitatea mitotică este esențială pentru vindecarea rănilor și alte tipuri de înlocuire celulară în anumite țesuturi. De exemplu, la oameni, celulele epidermice ale pielii și mucoasei intestinului sunt în mod continuu eliminate și înlocuite . La vertebrate, diviziunea celulară are ca rezultat și producția continuă de reticulocite, care în cele din urmă își vor elimina nucleele și vor reface numărul de globule roșii . În situații anormale, celulele somatice pot pierde controlul asupra diviziunii celulare , rezultând o tumoră .

În diviziunea nucleară, sau cariokineză, materialul genetic este împărțit între celulele fiice. Acest proces este foarte complex și necesită o mare precizie. Mai întâi, cromozomii trebuie duplicați cu precizie și apoi divizați exact . Rezultatul final este producerea a doi nuclei fiice, fiecare cu o compoziție cromozomială identică cu cea a celulei -mamă.

de diviziunea citoplasmatică , sau citokineză. Diviziunea citoplasmatică , mai puțin complexă, necesită un mecanism care are ca rezultat divizarea citoplasmei în două părți, urmată de confinarea celor două celule noi în membrane plasmatice diferite. Organelele citoplasmatice fie se auto-duplică din structurile membranoase existente, fie sunt sintetizate *de novo* în fiecare celulă.

După diviziunea celulară, dimensiunea inițială a noilor celule fiice este de aproximativ jumătate din dimensiunea celulei-mamă. Cu toate acestea, nucleul fiecăreia dintre celulele noi nu este apreciabil mai mic decât nucleul celulei din care provine. Măsurarea cantitativă a ADN-ului confirmă că există o cantitate echivalentă de material genetic în nucleele fiice în comparație cu nucleul-mamă.

Interfaza și ciclul celular

Multe celule prezintă o alternanță continuă între diviziune și nediviziune . Ceea ce se întâmplă de la sfârșitul unei diviziuni până la începutul următoarei constituie ciclul celular (Figura 2.5). Vom considera etapa inițială a ciclului, numită interfază, ca fiind intervalul dintre două diviziuni. Anterior se credea că activitatea biochimică din timpul interfazei era dedicată exclusiv creșterii celulare și funcției normale. Cu toate acestea, acum știm că o altă activitate biochimică, esențială pentru următoarea mitoză, are loc în timpul interfazei : *replicarea ADN -ului fiecărui cromozom.* Această perioadă în care se sintetizează ADN-ul se numește faza S și are loc înainte ca celula să înceapă mitoza. Momentul începerii și sfârșitului sintezei poate fi detectat prin monitorizarea încorporării - precursorilor radioactivi de ADN .

Cercetări de acest fel au demonstrat existența a două perioade în timpul interfazei , înainte și după faza S, în care sinteza ADN-ului nu are loc. Aceste faze sunt numite G1 (gapl) și respectiv G2 (gapll) . În ambele faze, precum și în timpul fazei S, au loc o activitate metabolică intensă , creșterea celulară și diferențierea . Spre sfârșitul G2 , volumul celular practic s -a dublat, replicarea ADN-ului a început și sinteza ADN-ului a început.

ei nu se împart

G1

Telofaza

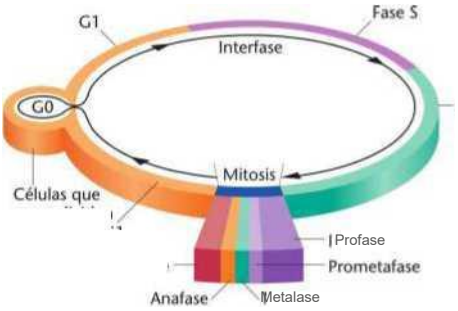


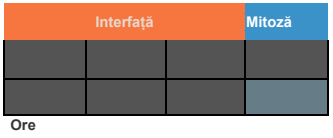
FIGURA 2.5 Fases que forman un ciclo celular típico. Después de la mitosis, la célula inicia la fase G1 de la interfase, comenzando un nuevo ciclo. Las células pueden no dividirse (GO) o continuar por G1, obligándose a comenzar la síntesis de ADN (S) y completar el ciclo (G2 y mitosis). Después de la mitosis se producirán dos células hijas y el ciclo comenzará de nuevo para ambas células.

mitozei (M). După mitoză , celulele care se divid continuu repetă acest ciclu (G1, S, G2, M) iar și iar, așa cum se arată în Figura 2.5.

O mare parte din cunoștințele noastre despre ciclul celular se bazează pe studii *in vitro* (din latinescul „în sticlă", adică într-o eprubetă). Atunci când sunt cultivate, multe tipuri diferite de celule din diverse organisme completează ciclul în aproximativ 16 ore. Mitoza ocupă doar o mică parte a ciclului, adesea mai puțin de o oră. Duratele fazelor S și G2 ale interfazei sunt destul de similare la diferite tipuri de celule. Cea mai mare variație constă în durata perioadei G1 . Figura 2.6 prezintă duratele relative ale acestor perioade, precum și diferitele faze ale mitozei, într-o celulă umană cultivată.

Faza G1 prezintă un mare interes în studiul proliferării celulare și al controlului acesteia. La un anumit punct în G1 , toate celulele urmează una dintre cele două căi posibile. Fie ies din ciclu și intră într-o fază de repaus, așa-numita fază GO *(vezi* Figura 2.5), fie sunt obligate să inițieze sinteza ADN-ului și să finalizeze ciclul. Celulele care intră în faza GO rămân viabile și active metabolic, dar nu se divid. Se pare că celulele canceroase evită să intre în GO sau trec prin el foarte repede . Alte celule intră în GO și nu repornesc niciodată ciclul celular. Și altele rămân în GO , dar pot fi stimulate să se întoarcă la G1, continuând ciclul celular.

Citologic, interfaza este caracterizată prin absența cromozomilor vizibili. În schimb, nucleul este umplut cu fibre de cromatină, care se formează pe măsură ce cromozomii se decondensează și se dispersează după mitoza anterioară (Figura 2.7(a)). Odată ce G1, S și G2 sunt complete, începe mitoza. Mitoza este o perioadă dinamică de activitate continuă și viguroasă. Pentru o mai bună înțelegere, întregul proces este subdivizat în faze discrete, iar fiecăreia i se atribuie evenimente specifice. Aceste etape, în



Pro	Met	Ana	Tel.
36	3	3	18 ani

Minute

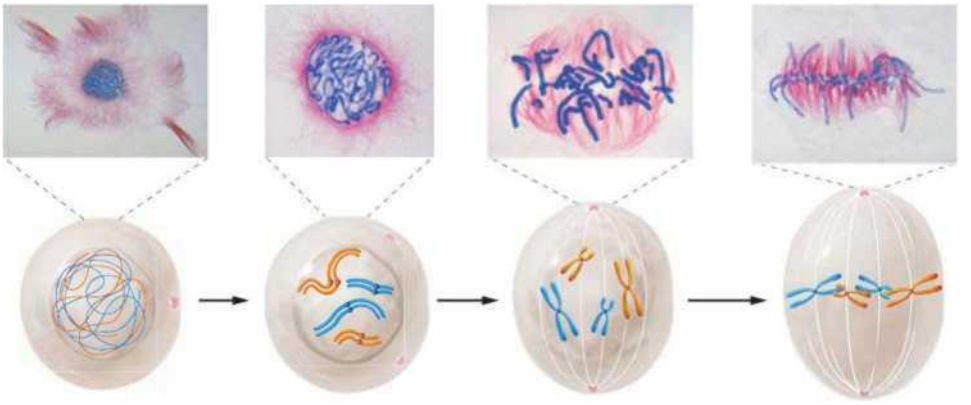
FIGURA 2.6 Durata fiecărei faze a unui ciclu celular complet al unei celule umane în cultură. Timpii variază în funcție de tipul de celulă *și* de condițiile de cultură. În ordine secvențială, acestea sunt profază, prometafază , metafază, anafază și telofază. Aceste faze sunt prezentate în Figura 2.7, împreună cu microfotografiile corespunzătoare.

Profază

Profaza durează adesea jumătate din mitoză [Figura 2.7 (b)], o fază caracterizată prin mai multe activități esențiale. Unul dintre cele mai timpurii evenimente ale profazei în toate celulele animale este migrarea a două perechi de centrioli către polii opuși ai celulei. Aceste structuri sunt situate în apropierea anvelopei nucleare, într-o regiune a citoplasmei diferențiate numită centrosom (discutată în Secțiunea 2.1). Se consideră că fiecare pereche de centrioli este formată dintr-o unitate matură și un centriol nou format, mai mic.

Direcția de migrare a centriolilor este astfel încât doi poli se stabilesc la capetele opuse ale celulei. Odată migrați, centriolii sunt responsabili de organizarea microtubulilor citoplasmatici, rezultând o serie de fibre fusiforme care se extind de la un pol la altul. Aceasta creează o axă de-a lungul căreia are loc separarea cromozomilor. Interesant este că, în majoritatea celulelor vegetale (cu foarte puține excepții), fungi și anumite alge, centriolii par să lipsească. Cu toate acestea, fibrele fusiforme sunt clar vizibile în timpul mitozei . Prin urmare , se poate spune că centriolii nu sunt singurele structuri - responsabile de organizarea fibrelor fusiforme.

Pe măsură ce centriolii migrează, anvelopa nucleară începe să se descompună și să dispară treptat. În mod similar, nucleolii din nucleu se dezintegrează . În timp ce aceste evenimente au loc, fibrele difuze de cromatină încep să se condenseze, un proces care continuă până când structurile filamentoase, cromozomii , devin vizibile . Spre sfârșitul profazei, devine clar că fiecare cromozom este o structură dublă, divizată longitudinal, cu excepția unei singure constricții, centromerul. Cele două părți ale fiecărui cromozom se numesc cromatide surori, deoarece ADN-ul din fiecare este identic genetic, rezultând din duplicarea unui singur cromozom. Cromatidele surori sunt ținute împreună de un complex proteic compus din mai multe subunități numit coezină. Acest complex molecular se formează inițial între cele două cromatide surori în timpul fazei S a ciclului celular, când ADN -ul fiecărui cromozom este replicat . Prin urmare, chiar dacă nu putem vedea cromatidele în timpul interfazei, deoarece cromatina este derulată și dispersată în nucleu , cromozomii sunt deja structuri duble, ceea ce devine evident în ultima parte a profazei. La om, cu un număr diploid de 46, prepararea citologică de la sfârșitul profazei relevă



(a) Interfață

Cromozomii sunt extinși și derulați, formând cromatina.

(b) Profaza

Cromozomii se încolăcesc și se scurtează; centriolii se divid și se separă.

(c) Prometafază

Cromozomii formează în mod clar structuri duble; centriolii ajung la poli opuși; se formează fibrele fusului de diviziune.

(d) Metafază

Centromerii se aliniază pe placa metafazică.

www.medilibros.co

Placa celular

Telofase de

celulă vegetală

(e) Anafază

Centromerii se divid.
iar cromozomii fiice migrează către poli opuși; începe citokineza.

(f) Telofază

Sosesc cromozomii fiice .

FIGURA 2.7 Mitoza într-o celulă animală cu un număr diploid de 4. Textul descrie ce se întâmplă în fiecare fază. Dintre cele două perechi de cromozomi omologi, unul are cromozomi metacentrici lungi, iar celălalt are cromozomi submetacentrici mai scurți. Cromozomii paterni și materni sunt reprezentați în culori diferite. (f) prezintă telofaza târzie a unei celule vegetale, cu formarea plăcii celulare și absența centriolilor. Micrografiile optice care ilustrează fazele mitozei sunt ale florii de *Haemanthus,* o plantă cu un număr diploid de 8.

46 de astfel de structuri cromozomiale distribuite aleatoriu în zona ocupată anterior de nucleu.

Prometafaza și metafaza

Trăsătura distinctivă a fazei următoare este migrarea fiecărui cromozom, ghidat de regiunea sa centromerică, către planul ecuatorial. Planul ecuatorial, numit și *placa metafazică, este situat pe* linia mediană a celulei , perpendicular pe axa stabilită de fibrele fusului de sarcină . În unele publicații, termenul prometafază se referă la perioada în care cromozomii migrează [Figura 2.7(c)], în timp ce termenul metafază se aplică strict configurației cromozomiale care apare după această migrare.

Migrarea este posibilă prin atașarea fibrelor fusului de kinetocorul cromozomului , o structură proteică multistratificată asociată cu centromerul. Această structură se formează pe laturile opuse ale fiecărui centromer pereche , în strânsă asociere cu cele două cromatide surori. Odată atașată la microtubulii care formează fibrele fusului, coezina este degradată de o enzimă numită în mod potrivit *separază,* iar brațele cromatidelor surori se separă, cu excepția regiunii centromerului. O familie specială de proteine numită shugoshin (din cuvântul japonez care înseamnă „spirit păzitor") protejează coezina în regiunile centromerice, împiedicând separaza să o degradeze. Figura 2.8 prezintă interacțiunea complexelor de coezina și shugoshin cu o pereche de cromatide surori în timpul mitozei.

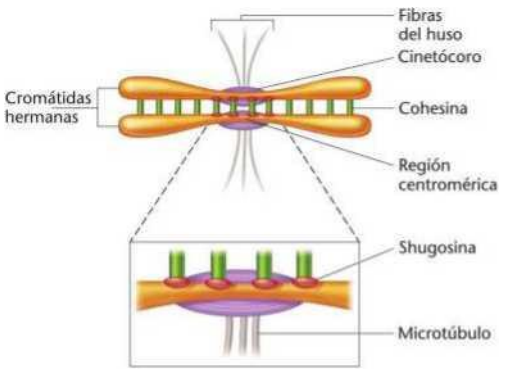


FIGURA 2.8 Descrierea alinierii, împerecherii *și* separării cromatidelor surori în timpul mitozei, proces în care sunt implicate complexele moleculare cohesină *și* shugoșină *și* enzima separază.

Știm destul de multe despre fibrele fusului de nucleotidă . Acestea sunt alcătuite din microtubuli, care la rândul lor sunt alcătuiți din subunități moleculare ale proteinei tubulinei (am menționat deja că există microtubuli derivați din tubulină , care face parte și ea din citoschelet). Se pare că microtubulii provin și cresc din cele două regiuni centrozomale (unde se află centriolii) la polii opuși ai celulei. Sunt structuri dinamice care se lungesc sau se scurtează ca o consecință a adăugării sau pierderii subunităților polarizate ale tubulinei. Microtubulii cel mai direct implicați în migrarea cromozomilor intră în contact cu kinetocorii și se atașează de aceștia pe măsură ce cresc din regiunea centrozomală. Aceștia se numesc microtubuli kinetocorici , iar un capăt este situat în apropierea centrosomului (la unul dintre polii celulei) , celălalt capăt fiind atașat de kinetocor. Este interesant de observat că numărul de microtubuli atașați de kinetocor variază considerabil între diferite organisme. La drojdie *(Saccharomyces)* Există un singur microtubul atașat de fiecare dintre structurile laminare ale kinetocorului. La cealaltă extremă se află celulele mitotice ale mamiferelor, unde 30 până la 40 de microtubuli sunt atașați de fiecare parte a kinetocorului.

Când metafaza se termină, fiecare centromer este aliniat pe placa metafazică , cu brațele cromozomilor extinse spre exterior într-un aranjament aleatoriu. Această configurație este prezentată în Figura 2.7 (d).

Anafază

În anafază, cea mai scurtă fază , au loc evenimentele esențiale legate de distribuția cromozomilor în mitoză . În această fază, cromatidele surori ale fiecărui cromozom, ținute împreună doar de regiunea lor centromerică, *se separă* - eveniment numit disjuncție - și migrează către polii opuși ai celulei . Pentru ca separarea completă să aibă loc: (1) shugoshinul trebuie degradat , inversându- și rolul protector ; (2) complexul de coezină care ține împreună regiunile centromerice ale fiecărui cromozom suror este apoi scindat de separază ; și (3) cromatidele surori ale fiecărui cromozom sunt trase spre polii opuși ai celulei (Figura 2.8). Odată ce acest lucru s-a întâmplat , fiecare cromatidă este numită cromozom fiică.

Deplasarea cromozomilor fiice către polii opuși ai celulei depinde de atașarea fibrelor fusiforme la centromer. Cercetări recente au arătat că migrarea cromozomilor rezultă din activitatea unei serii de molecule specifice , numite proteine motorii, situate în diverse locuri din interiorul celulei în diviziune . Aceste proteine, cunoscute sub numele de motoare moleculare, utilizează energia

generată de hidroliza ATP-ului . Efectul lor asupra activității microtubulilor scurtează în cele din urmă fibrele fusiforme , trăgând cromozomii spre capetele opuse ale celulei. Centromerii fiecărui cromozom *par* să deschidă calea în timpul migrării , trăgând brațele cromozomilor în spatele lor. Au fost propuse mai multe modele pentru a explica scurtarea fibrelor fusiforme . Aceste modele au elementul comun al îndepărtării selective a subunităților tubulinei de la capetele fibrelor fusiforme . Procesul de eliminare este realizat de proteine care acționează ca motoare moleculare, la care tocmai ne - am referit.

Poziția centromerului determină forma cromozomului în timpul separării, așa cum se arată în Figura 2.3. Etapele care au loc în anafază sunt esențiale pentru a oferi fiecărei celule fiice un set identic de cromozomi. În celulele umane , în acest moment ar exista 46 de cromozomi la fiecare pol, câte unul din fiecare dintre perechile surori originale. Figura 2.7 (e) prezintă anafaza înainte de finalizarea ei .

Telofază

Telofaza este faza finală a mitozei și este reprezentată în Figura 2.7(f). La începutul ei, există două seturi complete de cromozomi, câte unul la fiecare pol. Cel mai semnificativ eveniment este citokineza, diviziunea sau partiționarea citoplasmei. Citokineza este esențială dacă se dorește producerea a două celule noi dintr-o singură celulă . Mecanismul diferă considerabil între celulele animale și cele vegetale, dar rezultatul final este același: se formează două celule independente. În celulele vegetale, se sintetizează o placă celulară care se întinde peste celula în diviziune în regiunea plăcii metafazice. Cu toate acestea, celulele animale suferă o constricție a citoplasmei, la fel ca o șnur care se strânge în jurul regiunii ecuatoriale a unui balon.

Nu este surprinzător faptul că procesul de citokineză diferă în celulele diferitelor organisme. În celulele vegetale, care au o formă mai regulată și sunt rigide din punct de vedere structural, este necesar un mecanism pentru poziționarea noului perete celular în jurul membranei plasmatice. Placa celulară , care se formează în - timpul telofazei, devine lamela mijlocie. Ulterior, straturile peretelui celular primar și secundar se depun între membrana celulară și lamela mijlocie, de o parte și de alta a limitei dintre cele două celule fiice. La animale, odată ce constricția membranei celulare este completă , se formează șanțul celular, caracteristic celulelor nou divizate .

încep și alte procese necesare pentru tranziția de la mitoză la interfază . Acestea reprezintă, în general, o inversare a evenimentelor care au avut loc în profază. În fiecare celulă nouă, cromozomii încep să se deruleze și să revină la cromatina difuză, în timp ce anvelopa nucleară se reformează în jurul lor . Fibrele fusului nuclear dispar, iar nucleolii reapar treptat și devin complet vizibili în nucleu în timpul interfazei timpurii . La sfârșitul telofazei, celula intră în interfază.

Reglarea ciclului celular și punctele de control

Ciclul celular, care culminează cu mitoză, este fundamental identic la toate organismele eucariote. Această similaritate la atât de multe organisme diverse sugerează că ciclul celular este guvernat de un program reglat genetic, care a fost conservat de-a lungul evoluției . Întrucât eșecurile în această reglare pot fi responsabile pentru diviziunea celulară necontrolată ce caracterizează anumite boli, există un mare interes în a descoperi modul în care genele reglează ciclul celular.

Eforturile ample de cercetare depuse în ultimii 15 ani au dat rezultate remarcabile, iar acum cunoaștem numeroase gene implicate în controlul ciclului celular . Această muncă a fost recunoscută prin acordarea Premiului Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 2001 lui Lee Hartwell, Paul Nurse și Tim Hunt. Ca și în cazul altor studii privind controlul genetic al anumitor procese biologice esențiale, cercetarea s-a concentrat pe descoperirea - mutațiilor care perturbă ciclul celular, precum și pe efectele acestor mutații. Întrucât vom reveni la acest subiect în Capitolul 19, când vom discuta despre cancer, ne vom limita aici la o scurtă prezentare generală.

Acum cunoaștem numeroase mutații care influențează una sau alta dintre etapele ciclului celular. Descoperite inițial la drojdie, dar detectate acum la toate organismele, inclusiv la oameni, aceste mutații au fost inițial numite mutații *ale ciclului de diviziune celulară (CDC)* . Produșii normali ai multora dintre genele mutante sunt enzime numite kinaze, care pot adăuga fosfați altor proteine. Acestea servesc drept molecule de „control principal ” , funcționând împreună cu proteine numite cidine. Cidinele se leagă de aceste kinaze (creând *kinaze dependente de ciclină),* activându- le la momentele potrivite în timpul ciclului celular. Kinazele activate fosforilează apoi alte proteine care reglează progresul *ciclului* celular. Studiul mutațiilor *CDC* a stabilit că ciclul celular *conține* cel puțin trei *puncte de control* . Acestea sunt principalele molecule de control care supraveghează procesele care culminează cu mitoza normală . Moleculele responsabile de „verificarea” acestor procese înainte de începerea următoarei etape a diviziunii celulare sunt aceste molecule de control principale.

Punctele de control sunt denumite în funcție de etapa ciclului celular în care are loc monitorizarea.

(Figura 2.5). Primul dintre cele trei puncte de control, punctul de control G1/S, monitorizează dimensiunea celulei de la mitoza anterioară și evaluează, de asemenea, starea ADN-ului. Dacă celula nu a atins o dimensiune adecvată sau dacă ADN-ul a fost deteriorat, ciclul este oprit până când aceste condiții sunt corectate. Dacă ambele condiții sunt normale la G1/S, atunci celulei i se permite să treacă de la faza G1 la faza S a ciclului . Al doilea punct de control este punctul de control G2/M, unde ADN-ul este monitorizat înainte de începerea mitozei . Dacă replicarea ADN-ului este incompletă sau dacă se detectează orice deteriorare nereparată a ADN-ului, - ciclul celular este oprit. Ultimul punct de control are loc în timpul mitozei și se numește punctul de control M (uneori denumit punctul *de control al formării fusului celular).* În acesta, sunt monitorizate atât formarea corectă a sistemului de fibre fusiforme , cât și atașarea fibrelor fusiforme la kinetocorii asociați cu centromerii. Dacă fibrele fusiforme nu s-au format corect sau dacă atașarea este inadecvată , mitoza este oprită.

Importanța controlului ciclului celular și a acestor puncte de control poate fi ilustrată luând în considerare ce se întâmplă atunci când acest sistem de reglare funcționează defectuos. Să presupunem, de exemplu, că ADN-ul unei celule a fost deteriorat, ducând la una sau mai multe mutații care perturbă controlul ciclului celular . Dacă i se permite să continue ciclul celular și să formeze una dintre populațiile de celule în diviziune, această celulă modificată genetic s-ar diviza necontrolat - ceea ce este exact definiția unei celule canceroase. Dacă, în schimb, ciclul celular este oprit la unul dintre punctele de control, celula poate fi eliminată din populația de celule în diviziune, neutralizând astfel potențiala sa malignitate.

ACUM REZOLVĂ ASTA

2.1 Odată cu prima apariție a ceea ce numim „Acum rezolvă asta", este necesară o scurtă introducere. Veți întâlni acest tip de exerciții de mai multe ori în acest capitol și în următoarele. De fiecare dată, va fi prezentată o problemă care se referă la explicațiile tocmai date. Apoi, vi se va oferi un „sugestie" care vă poate ajuta să rezolvați problema. Iată primul dintre aceste exerciții.

(a) Dacă un organism are un număr diploid de 16, câte cromatide vor fi vizibile la sfârșitul profazăi mitozei?

(b) Câți cromozomi se vor deplasa la fiecare pol în timpul anafezei mitozei?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea a ceea ce se întâmplă cu fiecare pereche de cromozomi omologi în timpul mitozei . Cheia rezolvării acesteia este înțelegerea faptului că, pe parcursul mitozei, membrii fiecărei perechi de cromozomi omologi nu se împerechează, ci se comportă independent.*

2.4

Meioza reduce numărul de cromozomi de la diploid la haploid în celulele germinale și spori.

Meioza, spre deosebire de mitoză, înjumătățește cantitatea de material genetic. În timp ce la organismele diploide mitoza are ca rezultat celule fiice cu un set complet de cromozomi diploizi, meioza produce gameți sau spori cu doar un set haploid. În reproducerea sexuată, gameții se combină prin fertilizare pentru a restabili setul diploid, așa cum se găsește în celulele-mamă. Figura 2.9 compară cele două procese urmărind două perechi de - cromozomi omologi.

Meioza trebuie să fie extrem de specifică, deoarece, prin - definiție, gameții haploizi sau sporii au exact câte un membru din fiecare pereche de cromozomi omologi . Atunci când este finalizată cu succes, meioza asigură continuitatea genetică de la o generație la alta.

Reproducerea sexuată asigură, de asemenea, variația genetică - între indivizii unei specii. Atunci când studiem meioza, va deveni clar că acest proces are ca rezultat gameți cu multe combinații unice de cromozomi de la tată și mamă, în seturi haploide. Datorită enormei variații genetice a gameților, un număr mare de combinații cromozomiale sunt posibile la fertilizare. În plus, vom vedea că fenomenul meiotic numit crossing over are ca rezultat schimbul genetic între fiecare dintre membrii omologi ai unei perechi de cromozomi. Acest lucru produce cromozomi care sunt un mozaic al omologilor paterni și materni din care provin, intensificând potențiala variație genetică a gameților și a urmașilor lor. În consecință, reproducerea sexuată amestecă materialul genetic, rezultând urmași care adesea diferă foarte mult de părinții lor. Acest proces este cea mai importantă modalitate prin care informațiile genetice sunt combinate în cadrul unei specii.

Prezentare generală a meiozei

În discuția precedentă, am stabilit ceea ce am putea considera a fi obiectivele meiozei: reducerea cromozomilor la complementul haploid. Înainte de a analiza sistematic fazele acestui proces, vom examina pe scurt modul în care celulele diploide devin gameți sau spori haploizi.

Mitosis

Meioza I

Celulă diploidă
(2n = 4)

Prometafază

Profaza I
(sinapse)

Cromatide surori

Metafază (patru cromozomi, fiecare cu o pereche de cromatide surori)

Tétrada

Metafase
(dos tétradas)

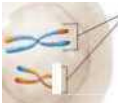
—J.

Anafază
Telofază

Diviziune reducțională

Célula hija
(2*n*)

Célula hija
(2*n*)

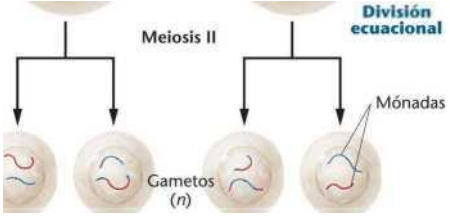


Diadas

Meiosis II

División ecuacional

Mónadas



Gametos
(*n*)

FIGURA 2.9 Prezentare generală a principalelor evenimente și rezultate ale mitozei *și* meiozei. Ca și în Figura 2.7 , sunt prezentate două perechi de cromozomi omologi.

În discuția următoare ne vom referi la partea meiozei din Figura 2.9.

Am văzut deja că în mitoză, fiecare dintre membrii paterni și materni ai unei anumite perechi de cromozomi omologi se comportă autonom în timpul diviziunii . În schimb, la începutul meiozei, - cromozomii omologi formează perechi; adică, fac sinapse. Fiecare structură sinapsată se numește bivalentă , care în cele din urmă...

Acest lucru va avea ca rezultat o unitate, tetrada, formată din patru cromatide . Prezența a patru cromatide demonstrează că ambii omologi (care formează bivalentul) s-au duplicat într-adevăr. Prin urmare, sunt necesare două diviziuni pentru a realiza haploidia. În meioza I, numită diviziune reducțională (deoarece numărul de centromeri, fiecare reprezentând un cromozom, este înjumătățit după această diviziune), componentele fiecărei tetrade - reprezentând cei doi omologi - se separă, producând două diade. Fiecare diadă este compusă din două cromatide surori unite printr-un singur centromer . În meioza II, numită diviziune ecuațională (deoarece numărul de centromeri rămâne constant după această diviziune), fiecare diadă se divide în două monade , fiecare cu un singur cromozom. Astfel, cele două diviziuni pot duce potențial la patru celule haploide.

Prima diviziune meiotică: profaza I

Să revenim acum la o descriere detaliată a meiozei . La fel ca mitoza, meioza este un proces continuu. Vom denumi părțile fiecărei faze de diviziune doar pentru a facilita discuția. Din punct de vedere genetic, există trei fapte care caracterizează faza inițială, profaza I (Figura 2.10). În primul rând, la fel ca în mitoză , cromatina prezentă în interfază suferă o îngroșare și o spiralare, dând naștere la cromozomi vizibili. Și, la fel ca în mitoză, fiecare cromozom este o structură dublă ținută împreună de complexul molecular numit *coezina.* În al doilea rând, spre deosebire de mitoză, membrii omologi ai fiecărei perechi de cromozomi suferă sinapsă. În al treilea rând, are loc crossing-over-ul, un proces de schimb, între omologii care fac sinapsă. Datorită complexității acestor fenomene genetice, această fază a meiozei a fost subdivizată în cinci subfaze: leptotenă, zigotenă, pahitenă, diplotenă și diakineză. Când discutăm despre aceste subfaze, este important să reținem că, deși nu este pe deplin evident în stadiile incipiente ale meiozei , ADN-ul cromozomilor a fost duplicat în interfaza precedentă.

Leptotenă: În subfaza leptotenică, materialul cromatinei din interfază începe să se condenseze, iar cromozomii, deși încă extinși, devin vizibili. De-a lungul fiecărui cromozom se află cromomeri, care sunt condensări localizate care seamănă cu mărgele pe un șir. Dovezi recente sugerează că în timpul leptotenei începe procesul cunoscut sub numele de căutare omologă , care precede și este esențial pentru inițierea împerecherii omoloage.

Zigoten: Cromozomii continuă să se scurteze și să se îngroașe în subfaza zigotenului. În procesul de împerechere omoloagă, cromozomii omologi trec printr-un

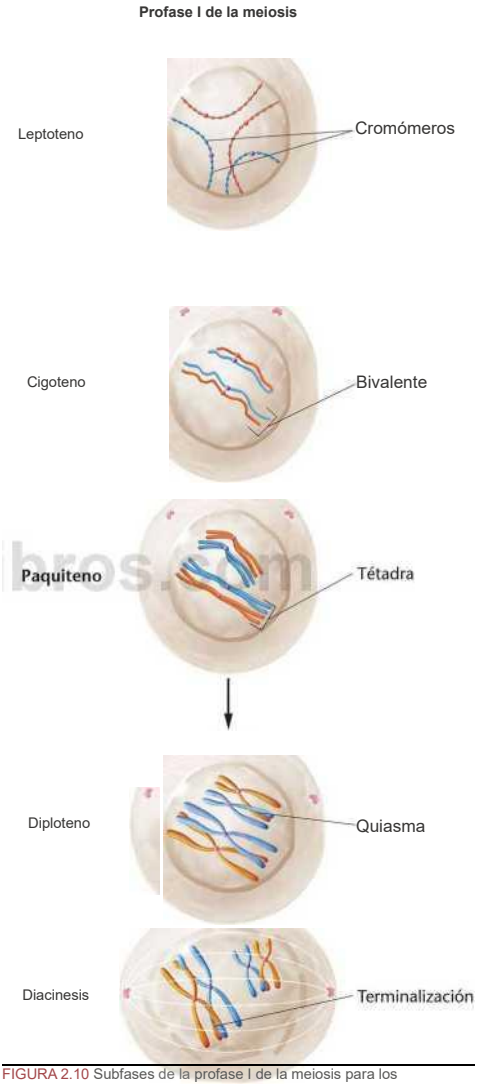


FIGURA 2.10 Subfases de la profase I de la meiosis para los cromosomas representados en la Figura 2.9.

Aliniere inițială unul cu celălalt. Această așa-numită *împerechere preliminară* este finalizată spre sfârșitul zigotenului . La drojdie, omologii sunt separați de aproximativ 300 nm, iar la sfârșitul zigotenului, structuri numite elemente laterale sunt vizibile între *omologii* împerecheați. Pe măsură ce meioza progresează , lungimea totală a elementelor laterale de-a lungul cromozomului crește, iar o componentă ultrastructurală mai mare, numită complex sinaptinemic, începe să se formeze între omologi. Se crede că acest complex este mecanismul responsabil pentru împerecherea omoloagă. La unele organisme diploide, această sinapsis are loc ca un fel de mecanism cu fermoar, începând cu capetele cromozomilor atașate la anvelopa nucleară.

Când zigotena se termină, omologii perechi formează o structură numită bivalentă. Deși ambii membri ai fiecărei bivalente și-au replicat deja ADN-ul, nu este încă evident că fiecare membru are o structură dublă. Numărul de bivalenți dintr -o anumită specie este egal cu numărul său haploid (ri).

Pahitenă: În tranziția dintre zigotenă și subfaza pahitenică, înfășurarea și scurtarea cromozomilor continuă, cu dezvoltarea ulterioară a complexului sinaptineal situat între cei doi membri ai fiecărui bivalent. Acest lucru are ca rezultat o împerechere mai strânsă numită sinapsis. Comparativ cu împerecherea preliminară caracteristică a pahitenei, omologii sunt acum separați de doar aproximativ 100 nm.

În timpul pahitenei, este deja evident că fiecare omolog este o structură dublă, oferind dovezi vizuale ale replicării anterioare a ADN-ului fiecărui cromozom. Astfel, fiecare bivalent are patru cromatide. Ca și în mitoză , replicile se numesc *cromatide surori,* în timp ce cromatidele paterne relative la cromatidele materne ale unei perechi omoloage se numesc *cromatide non-surori.* Structura cu patru membri se numește și tetradă, iar fiecare tetradă are două perechi de cromatide surori.

Diplotenă: În timpul următoarei subfaze, diplotena , devine și mai evident că fiecare tetradă este formată din două perechi de cromatide surori. În fiecare tetradă, fiecare pereche de cromatide surori începe să se separe. Cu toate acestea, unul sau mai multe puncte rămân în contact, loc unde cromatidele s-au împletit. Fiecare astfel de punct se numește chiasmă și se crede că reprezintă locul în care cromatidele non-surori au suferit schimb genetic prin procesul pe care l-am numit anterior *crossing-over.* Deși schimbul fizic dintre cromozomi are loc în subfaza precedentă a pahitenei , rezultatul crossing -over-ului este vizibil numai atunci când cromozomii duplicați încep să se separe. Crossing -ul este o sursă importantă de variabilitate genetică. După cum am menționat anterior, în timpul acestui proces se formează noi combinații de material genetic .

Diachineza. Subfaza finală a profazei I este diakineza. Cromozomii se separă în continuare, dar cromatidele non - surori rămân slab asociate prin chiasmate. Pe măsură ce separarea progresează , chiasmatele se deplasează spre capetele tetradei. Acest proces, numit terminalizare, începe spre sfârșitul diplotenei și se finalizează în timpul diakinezei . În această subfază finală a profazei I, nucleolul și anvelopa nucleară se descompun , iar cei doi centromeri ai fiecărei tetrade se atașează de fibrele fusului nuclear nou formate . Până la sfârșitul profazei I, centromerii fiecărei tetrade sunt localizați la placa metafazică a celulei.

Metafază, anafază și telofază I

Restul meiozei este descris în Figura 2.11. După prima profază meiotică I, urmează faze similare cu cele ale mitozei . În prima diviziune (metafază I), cromozomii s-au scurtat și s-au îngroșat deja până la lungimea lor maximă. Chiasmele terminale ale fiecărei tetrade sunt vizibile și par a fi principalele responsabile pentru menținerea împreună a celor două cromatide non-surori . Fiecare tetradă interacționează cu fibrele fusului de nucleotidă, facilitând mișcarea spre placa metafazică . Alinierea fiecărei tetrade înainte de această primă anafază este aleatorie. Jumătate din tetradă (una dintre diade) va fi trasă aleatoriu spre un pol sau altul , în timp ce cealaltă jumătate se va deplasa spre polul opus.

În timpul fazelor meiozei I, perechea de cromatide surori este ținută împreună de o singură regiune centromerică. Această regiune apare ca o singură unitate, cu un kinetocor care se formează în jurul fiecărei cromatide. Ca și în explicația noastră despre mitoză *(vezi* (Figura 2.8), coezina joacă rolul principal în menținerea laolaltă a cromatidelor surori. În anafaza I, coezina prezentă între cromatidele surori este degradată , cu excepția regiunii centromerice , care , la fel ca în mitoză , este protejată de un complex shugoshiin . Apoi, jumătate din fiecare tetradă, o diadă, este trasă spre fiecare pol al celulei în diviziune . Acest proces de separare este baza fizică a ceea ce numim disjuncție, care este separarea cromozomilor omologi . Ocazional, în meioză apar erori , iar această separare nu se realizează . Termenul de non-disjuncție descrie un astfel de eșec . Când o anafază I normală se termină, există un număr de diade la fiecare pol egal cu numărul haploid .

Dacă încrucișarea nu ar fi avut loc în prima profază meiotică , fiecare diadă de la fiecare pol ar fi fost formată fie din cromatide materne , fie din cromatide paterne . Cu toate acestea , schimbul care are loc prin încrucișare are ca rezultat cromatide mozaicate, atât de origine paternă, cât și maternă.

În telofaza I a multor organisme, se formează o membrană nucleară în jurul diadelor. Nucleul intră apoi într-o scurtă perioadă de interfază. Deși există o perioadă de interfază, cromozomii nu se replică, deoarece sunt deja compuși din două cromatide. În alte cazuri, celulele trec direct de la anafaza I la diviziunea meiotică II. În general, telofaza meiotică este mult mai scurtă decât faza mitotică corespunzătoare.

A doua diviziune meiotică

cromatidelor surori care alcătuiesc fiecare diadă, numită **meioză II**, este esențială dacă fiecare gamet sau spor urmează să primească o singură cromatidă de la fiecare dintre tetradele originale. Etapele care caracterizează meioza II sunt prezentate în partea dreaptă a Figurii 2.11. În profaza II, fiecare diadă constă dintr-o pereche de cromatide surori unite printr-un centromer comun. În metafaza II , centromerii se aliniază la placa ecuatorială. Când complexul shugoshiin se degradează , centromerii se separă, începe anafaza II , iar cromatidele surori ale fiecărei diade se deplasează spre polii opuși. Deoarece numărul de diade este egal cu numărul haploid, până în telofaza II, câte un membru al fiecărei perechi de cromozomi omologi se găsește la fiecare pol. Fiecare cromozom este acum o monadă. După citokineză, în telofaza II, pot fi produși patru gameți haploizi ca urmare a unei singure diviziuni meiotice. La sfârșitul meiozei, nu numai că se va atinge starea haploidă, dar, dacă a avut loc încrucișarea, fiecare monadă va fi o combinație de informații genetice paterne și materne . Prin urmare , urmașii produși prin unirea gameților vor primi un amestec din informațiile genetice prezente inițial la bunicii lor paterni sau materni. Din acest motiv, meioza crește semnificativ nivelul de variație genetică în fiecare generație succesivă.

ACUM REZOLVĂ ASTA

2.2 Un organism are un număr diploid de 16 în ovocitul primar. (a) Câte tetrade vor exista în prima profază meiotică? (b) Câte diade vor exista în a doua profază meiotică? (c) Câte monade vor migra către fiecare pol în timpul celei de-a doua anafeze meiotice?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea a ceea ce se întâmplă cu membrii paterni și materni ai fiecărei perechi de cromozomi omologi în timpul meiozei. Ideea principală pentru rezolvarea acestei probleme este de a înțelege că omologii paterni și materni sunt în sinopsis în timpul meiozei. Odată ce fiecare cromatidă s-a duplicat, rezultând o tetradă în stadiile incipiente ale meiozei, fiecare pereche originală se comportă ca o unitate și dă naștere la două diade în anafaza I.*

2,5

Dezvoltarea gameților variază în timpul spermatogenezei și ovogenezei

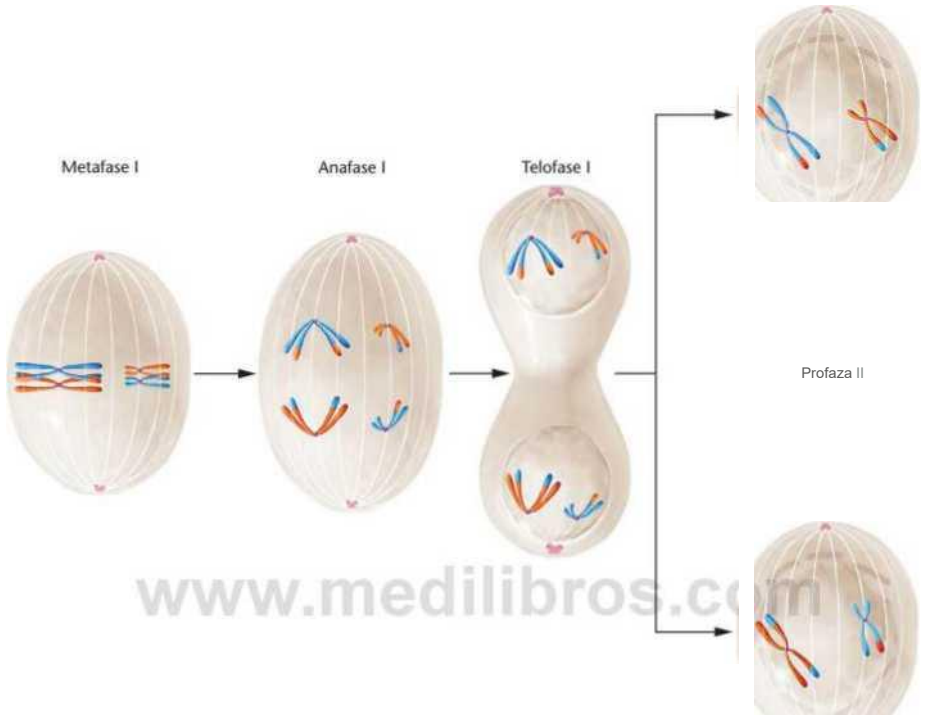
Deși ceea ce se întâmplă în timpul diviziunilor meiotice este similar în toate celulele implicate în gametogeneză , la majoritatea speciilor animale există anumite diferențe între producerea unui gamet masculin (spermatogeneză) și cea a unui gamet feminin (oogeneză). Aceste procese sunt rezumate în Figura 2.12 .

Spermatogeneza are loc în testicule , organele de reproducere masculine. Procesul începe cu creșterea ulterioară a unei celule germinale diploide nediferențiate numite spermatogoniu . Această celulă crește în dimensiune până când devine un spermatocit primar, care suferă prima diviziune meiotică . Produșii acestei diviziuni se numesc spermatocite secundare, care au un număr haploid de diade. Spermatocitele secundare suferă apoi a doua diviziune meiotică, iar fiecare dintre aceste celule produce două spermatide haploide. Printr-o serie de modificări de dezvoltare numite spermiogeneză, spermatidele devin spermatozoizi mobili și extrem de specializați . Toți spermatozoizii produși în timpul spermatogenezei conțin un număr haploid de cromozomi și o cantitate egală de citoplasmă .

La masculii maturi, spermatogeneza poate fi continuă sau poate apărea periodic, debutul ei fiind determinat de ciclul reproductiv al speciei. Animalele care se reproduc pe tot parcursul anului produc spermatozoizi continuu , în timp ce cele cu un sezon de reproducere limitat la o anumită perioadă a anului produc spermatozoizi numai în acel sezon.

În ovogeneza animală, formarea ovulelor are loc în ovare, organele reproducătoare feminine. Celulele fiice rezultate din cele două diviziuni meiotice primesc cantități egale de material genetic, dar *nu* cantități egale de citoplasmă. În fiecare diviziune celulară , aproape toată citoplasma ovocitului primar, derivată din oogoniu, este concentrată într-una dintre cele două celule fiice . Această concentrare de citoplasmă este necesară deoarece una dintre principalele funcții ale ovulului matur este de a hrăni embrionul în curs de dezvoltare după fertilizare.

În prima anafază meiotică a ovogenezei, tetradele ovocitului primar se separă , iar diadele migrează spre poli opuși. În prima telofază, diadele de la un pol se separă, înconjurate de foarte puțină citoplasmă , pentru a forma primul corp polar.



www.medilibros.com

FIGURA 2.11 Principalele evenimente ale meiozei într -o celulă animală , cu un număr diploid de 4, începând cu metafaza I. Se poate observa că combinațiile de cromozomi din celule, care apar după telofaza II, depind de alinierea aleatorie a fiecărei tetrade și diade pe planurile ecuatoriale în timpul metafazelor I și II. Se pot forma multe alte combinații, care nu sunt prezentate. Evenimentele descrise aici sunt descrise în text .

Primul corp polar se poate diviza sau nu pentru a produce două celule haploide mici. Cealaltă celulă fiică produsă în această primă diviziune meiotică primește cea mai mare parte a citoplasmei și se numește ovocit secundar. Ovulul matur se va dezvolta din ovocitul secundar în a doua diviziune meiotică. În această diviziune, citoplasma ovocitului secundar este din nou divizată inegal, rezultând o ootidă și un al doilea corp polar. Ootida se diferențiază ulterior în ovulul matur.

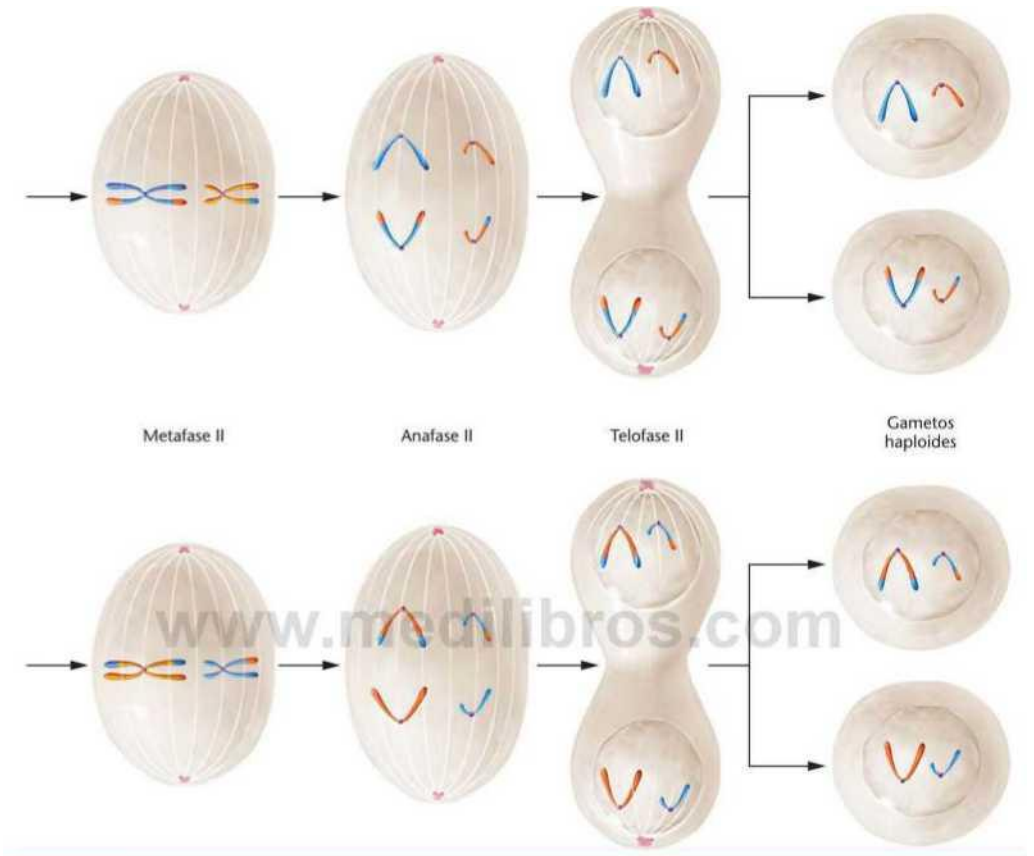
Spre deosebire de diviziunile spermatogenezei, cele două diviziuni meiotice ale ovogenezei pot să nu fie consecutive. La unele specii de animale, cele două diviziuni au loc una după alta . La altele, inclusiv la oameni , prima diviziune a tuturor ovocitelor

începe în ovarul embrionar, dar este oprită în profaza I. Mulți ani mai târziu, meioza se reia în fiecare ovocit chiar înainte de ovulație. A doua diviziune este completă numai după fertilizare.

ACUM REZOLVĂ ASTA

2.3 Examinați Figura 2.12, care prezintă oogeneza în celulele animale . Va fi genotipul celui de-al doilea corp polar (derivat din meioza II) întotdeauna identic cu cel al ootidei? De ce sau de ce nu ?

- **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea modului în care - funcționează meioza în timpul oogenezei . Cheia soluției sale este să ne amintim că încrucișarea a avut loc între fiecare pereche de cromozomi omologi în timpul meiozei*



www.medilibros.com

FIGURA 2.11 (*continuación*)

I.

Meioza este esențială pentru reproducerea sexuată la toate organismele diploide

Meioza este esențială pentru reproducerea sexuată cu succes la toate organismele diploide. Este mecanismul prin care cantitatea diploidă de informație genetică este redusă la cantitatea haploidă. La animale, meioza are ca rezultat formarea de gameți, în timp ce la plante produce spori haploizi , care la rândul lor dau naștere la formarea de gameți haploizi.

Fiecare organism diploid își stochează informațiile genetice sub formă de perechi de cromozomi omologi. Fiecare pereche constă dintr -un cromozom derivat de la mamă și unul de la tată . După meioză , celulele haploide conțin potențial fie reprezentantul patern , fie cel matern al fiecărei perechi de cromozomi omologi . Cu toate acestea, procesul de crossing-over care are loc în timpul primei profază meiotice reorganizează alelele între membrii paterni și materni ai fiecărei perechi omoloage, care apoi se separă și sunt atribuite independent gameților . Aceste evenimente sunt responsabile pentru marea diversitate genetică prezentă în gameți .

Este important să menționăm pe scurt rolul important pe care îl joacă meioza în ciclurile biologice ale fungilor.

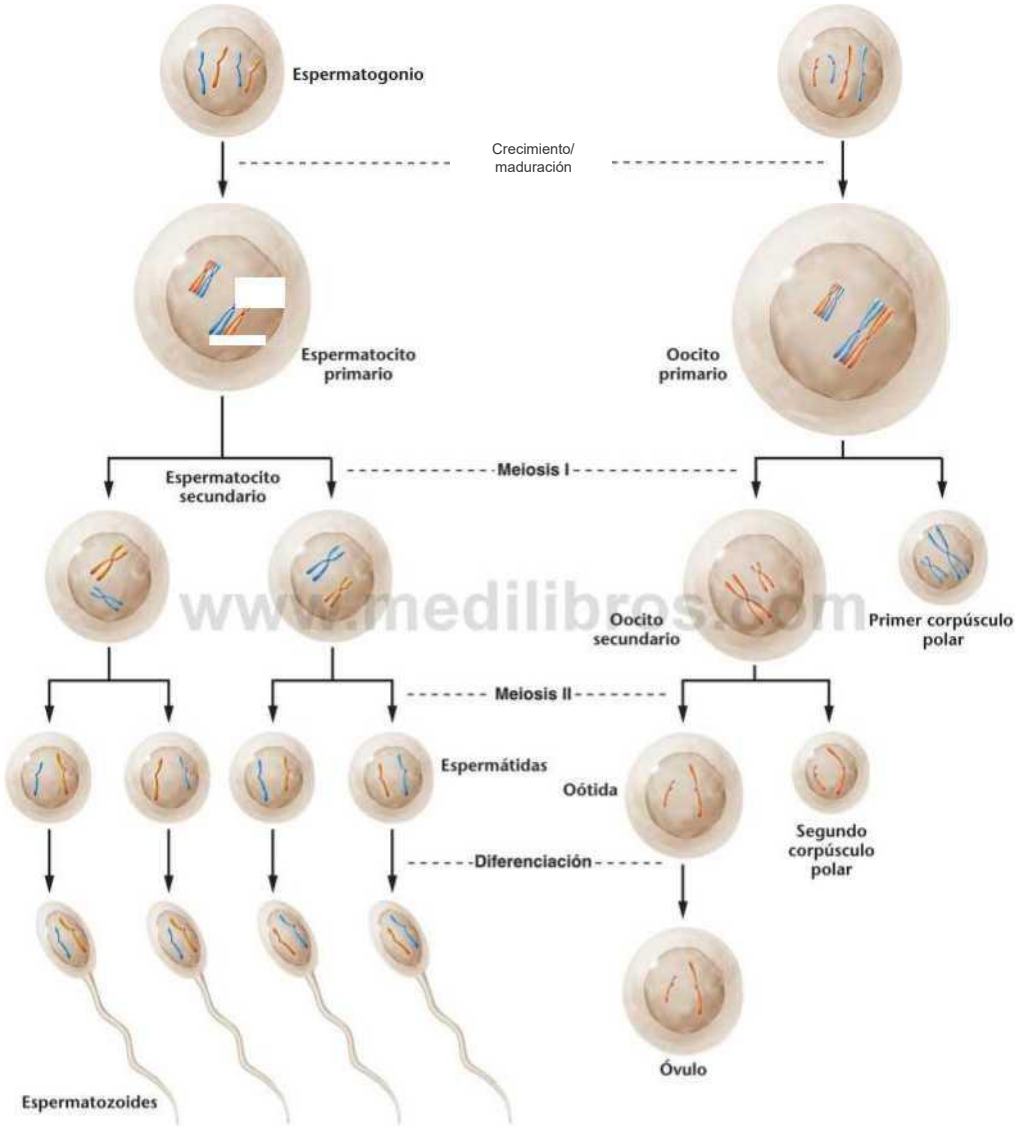


FIGURA 2.12 Espermatogénesis y oogénesis en células animales.

și plante. La multe ciuperci, stadiul predominant al ciclului de viață este cel al celulelor vegetative haploide. Acestea sunt produse prin meioză și proliferează prin diviziunea celulară mitotică. La plantele multicelulare, ciclul de viață alternează între faza sporofitică diploidă și faza gametofitică haploidă (Figura 2.13). În timp ce una sau alta dintre acestea

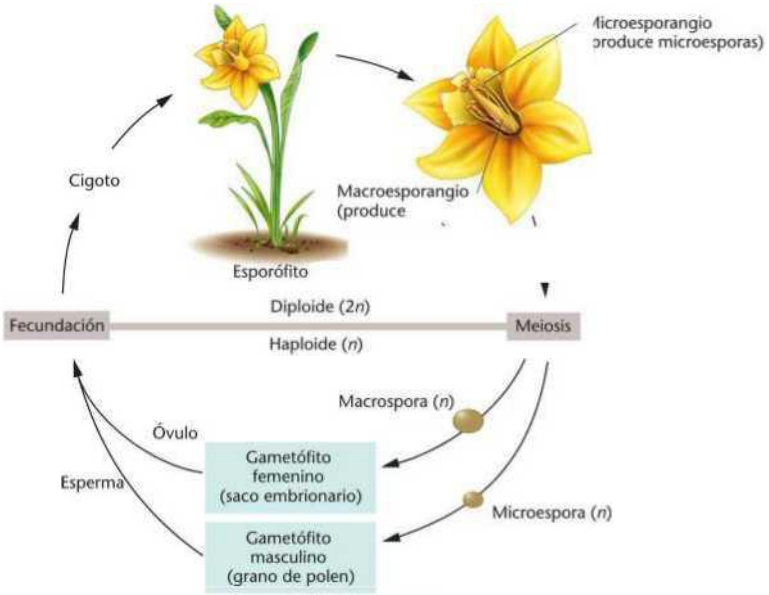


FIGURA 2.13 Alternarea generațiilor între sporofitul diploid (2n) și gametofitul haploid (n) la o plantă multicelulară. Procesele de meioză și fertilizare fac legătura între cele două faze ale ciclului de viață . La angiosperme (plante cu flori), cum ar fi cea prezentată aici, faza sporofitică este predominantă.

Fazele care predomină la diferite grupuri de plante în timpul acestei „alternanțe de generații" sunt meioza și fecundarea, care constituie „puntea" dintre fazele sporofitică și gametofitică. Prin urmare, meioza este o componentă esențială în ciclul biologic al plantelor.

Microscopia electronică a dezvăluit structura fizică a cromozomilor mitotici și meiotici

Până în acest moment, ne-am concentrat asupra cromozomilor mitotici și meiotici , evidențiind rolul lor în diviziunea celulară și formarea gameților. Ne-am putea întreba de ce cromozomii sunt invizibili în timpul interfazei, dar vizibili în diferite faze ale mitozei și meiozei. Studiile de microscopie electronică demonstrează clar de ce cromozomii sunt vizibili doar în timpul fazelor de diviziune.

În nucleul interfazic se găsesc doar fibre de cromatină dispersate [Figura 2.14(a)]. Cu toate acestea, odată ce începe mitoza, fibrele se răsucesc și se pliază, condensându-se în cromozomi mitotici tipici [Figura 2.14 (b)]. Dacă fibrele care alcătuiesc cromozomii mitotici sunt slăbite , regiunile mai nerăsucite dezvăluie fibre similare cu cele observate în cromatina interfazică [Figura 2.14 (c)]. Se pare că există foarte puține fibre cu capete libere și, în unele cazuri, nu se observă niciuna . Dimpotrivă , fibrele par întotdeauna să se curbeze spre interior. Evident, astfel de fibre sunt răsucite și pliate una peste alta, dând naștere aspectului normal al cromozomilor mitotici. Începând cu telofaza târzie a mitozei și continuând prin perioada G1 a interfazei , cromozomii se desfășoară pentru a forma fibrele lungi caracteristice ale cromatinei

, care constau din ADN și proteine asociate , în special proteine numite tilatone . În această configurație fizică , ADN -ul poate funcționa cel mai eficient în timpul transcripției și replicării .

Observarea cromozomilor mitotici cu microscopul electronic în diferite stări de înfășurare l-a condus pe Ernest DuPraw la postularea modelului fibrei plisate , prezentat în Figura 2.14(c). În metafază , fiecare cromozom este format din două cromatide surori, unite prin regiunea centromerică . Fiecare braț al cromatidei

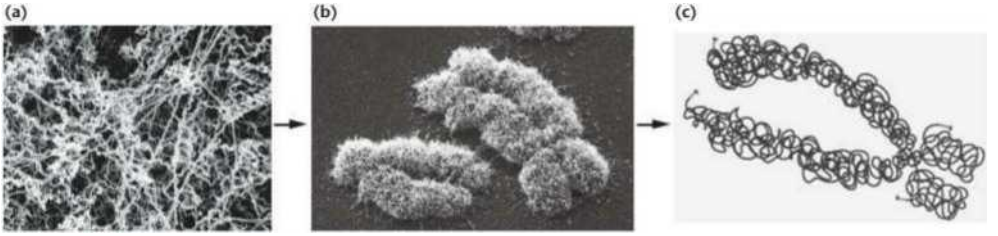


FIGURA 2.14 Comparație între (a) fibrele de cromatină, caracteristice nucleului interfazic, și (b) cromozomii metafazici derivați din cromatină în timpul mitozei. Partea (c) prezintă schematic un cromozom mitotic, arătând cum se condensează cromatina pentru a-l forma. Partea (a) este o micrografie electronică de transmisie , în timp ce (b) este o micrografie electronică de scanare .

Se pare că este format dintr-o singură fibră încolăcită ca un ghem de fire. Această fibră dens încolăcită este compusă din ADN bicatenar și proteine. Un proces ordonat de încolăcire, împletire și condensare pare să fie implicat în tranziția de la cromatina în interfază la cromozomii mitotici mai condensați. Geneticienii cred că în timpul tranziției de la interfază la profază, are loc o contracție de aproximativ 5.000 de ori a lungimii ADN-ului în interiorul fibrei de cromatină! Acest proces trebuie să fie extraordinar de precis, având în vedere aspectul ordonat și consistent al cromozomilor mitotici la toate eucariotele. Observați în special în micrografii distincția clară dintre cromatidele surori care alcătuiesc fiecare cromozom. Acestea sunt unite doar printr-un centromer comun, pe care îl împart de dinainte de anafază.

DE GENOMICĂ

PubMed: explorarea și accesarea literaturii biomedicale

Área de estudio. Exploración de ¡a Genómica

ȘI În această eră a expansiunii - rapide a informațiilor despre genomică și știință biomedicale , oamenii de știință trebuie să se familiarizeze cu utilizarea diverselor baze de date online. Aceste resurse oferă acces la secvențe de ADN și proteine , date genomice, hărți cromozomiale, rețele de cipuri de expresie genică și structuri moleculare, precum și la instrumentele bioinformatice necesare pentru manipularea datelor. Probabil cea mai fundamentală bază de date este PubMed , un instrument online pentru căutarea literaturii și publicațiilor biomedicale.

PubMed este un motor de căutare pe internet , dezvoltat de NCBI (Centrul Național pentru Informații Biotehnologice) la Biblioteca Națională de Medicină a SUA . Folosind PubMed, puteți accesa peste 15 milioane de articole din peste 4.600 de reviste biomedicale. Textul integral al multora dintre aceste reviste poate fi obținut electronic prin intermediul bibliotecilor universitare , iar unele reviste (cum ar fi **Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *Genome Biology* și *Science*) sunt, de asemenea, disponibile*. Acestea oferă acces public gratuit la articole, cu anumite limitări de timp.

În acest exercițiu, vom explora PubMed - pentru a răspunde la întrebări despre relațiile dintre tubulină, cancerele umane și terapiile împotriva cancerului , precum și despre genetica spermatogenezei.

■ Exercițiul I. Tubulină, cancer și mitoză În acest capitol, am discutat despre tubulină și comportamentul dinamic al microtubulilor în timpul ciclului celular. Celulele canceroase sunt caracterizate prin diviziuni mitotice continue și necontrolate.

Este posibil ca tubulina și microtubulii să contribuie la dezvoltarea cancerului? Ar putea aceste structuri importante să fie ținte valide pentru terapiile împotriva cancerului?

1. Pentru a începe căutarea de răspunsuri, accesați site-ul PubMed la www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB-pubmed .

2. În caseta CĂUTARE, tastați „tubu lin cancer” și apoi faceți clic pe butonul „Start” pentru a efectua căutarea .

3. Selectați mai multe articole de cercetare și citiți rezumatele.

Pentru a răspunde la întrebarea despre asocierea tubulinei cu cancerul, puteți încerca să vă limitați căutarea la un număr mai mic de articole, poate la cele care sunt articole de sinteză. Pentru a face acest lucru:

1. Selectați fila „Limite” din partea de sus a paginii.
2. Derulați în jos pe pagină și selectați „Recenzie” din lista „Tip de articol”.
3. Selectați „Start” pentru a efectua căutarea .

Explorați unele dintre articole sub formă de rezumate sau consultând textul integral , disponibil în bibliotecă sau prin acces public gratuit. Pregătiți un scurt raport sau împărtășiți verbal experiența voastră cu restul clasei . Descrieți două dintre cele mai importante lucruri pe care le-ați învățat în timpul acestei sarcini de explorare și identificați sursele de informații pe care le - ați întâlnit în timpul căutării .

■ Exercițiul II. Modificări ale spermatogenezei la om

Folosind metodele descrise în Exercițiul I, identificați câteva afecțiuni asociate cu spermatogeneza defectuoasă la om. Ce gene umane sunt implicate în spermatogeneză? Cum duc defectele acestor gene la afecțiuni legate de fertilitate? Pregătiți un scurt raport oral sau scris despre ceea ce ați învățat și sursele utilizate pentru a obține informațiile.

STUDIU DE CAZ | Timpul este totul

Un bărbat de puțin peste douăzeci de ani primește chimioterapie și radioterapie la fiecare 60 de zile pentru limfomul Hodgkin . După mai multe încercări nereușite de a avea copii, își analizează sperma la o clinică de fertilitate , unde sunt descoperite multiple nereguli cromozomiale . La examinarea la mai puțin de cinci zile după tratament, se detectează frecvent cromozomi suplimentari sau absența unuia sau mai multor cromozomi . Cu toate acestea, aceste nereguli nu sunt observate la 38 de zile după tratament .

SAU

1. Cum poate explica un genetician diferențele în neregularitățile cromozomiale în timp ?
2. Credeți că expunerea unui spermatogoniu la chimioterapie și radioterapie ar cauza mai multe probleme decât dacă cel expus ar fi un spermatocit secundar?
3. Care este recomandarea evidentă care i s -a făcut acelui pacient, în ceea ce privește fertilitatea, pe întreaga durată a tratamentului?

Puncte de rezumat

1. Structura celulelor este elaborată și complexă. Există numeroase componente celulare implicate direct sau indirect în procesele genetice.
2. În organismele diploide , cromozomii se găsesc în perechi omoloage . Fiecare membru al perechii are aceeași dimensiune, aceeași poziție a centromerului și aceleași gene în aceleași locații. Un membru al fiecărei perechi provine de la tată, iar celălalt de la mamă.
3. Mitoza și meioza sunt mecanisme prin care celulele distribuie informația genetică , care se găsește în cromozomi , descendenților lor într -un mod precis și ordonat .
4. Mitoza , o componentă a ciclului celular, este subdivizată în faze discrete care descriu inițial condensarea cromatinei în numărul diploid de cromozomi. Fiecare cromozom apare inițial ca o structură dublă, compusă dintr - o pereche de cromatide surori identice unite printr - un centromer comun. Pe măsură ce mitoza progresează, centromerii se divid , iar cromatidele surori sunt separate prin fibre fusiforme și trase spre polii opuși ai celulei . Apoi are loc diviziunea citoplasmatică , creând două celule noi cu informații genetice identice cu cele ale celulei - mamă .

Pentru a vedea activități, animații și întrebări de recapitulare, consultați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

5. Meioza transformă o celulă diploidă în gameți sau spori haploizi, făcând posibilă reproducerea sexuată . Ca urmare a duplicării cromozomilor, sunt necesare încă două diviziuni meiotice pentru a realiza haploidia, fiecare celulă haploidă primind câte un membru din fiecare pereche de cromozomi omologi în timpul procesului.
6. Există o diferență importantă între meioza masculină și cea feminină . În spermatogeneză, volumul citoplasmatic este împărțit în mod egal și se produc patru spermatozoizi haploizi . Cu toate acestea, în ovogeneză, cea mai mare parte a citoplasmei se acumulează într- o singură celulă, ovulul, celelalte produse haploide fiind reduse la corpi polari. Citoplasma suplimentară din ovul contribuie la dezvoltarea zigotului după ce a avut loc fertilizarea .
7. Meioza dă naștere unei variații genetice enorme, datorită schimbului de segmente cromozomiale în timpul încrucișării dintre cromatidele materne și paterne, precum și datorită segregării aleatorii a cromatidelor materne și paterne între gameți. În plus, meioza joacă un rol important în ciclul de viață al fungilor și plantelor , servind ca o punte între generații.
8. Cromozomii mitotici se formează prin înfășurarea și densificarea fibrelor de cromatină din interfază , dând naștere formei caracteristice a cromatidelor.

IDEI ȘI SOLUȚII

Odată cu prima apariție a secțiunii „Idei și soluții", este potrivit să descriem pe scurt importanța acesteia pentru studenți. Această secțiune va preceda „Probleme și întrebări pentru discuții" în fiecare capitol și va oferi exemple de probleme și soluții care ilustrează abordări utile în analiza genetică. Ideile pe care le veți dobândi lucrând cu această secțiune vă vor ajuta să ajungeți la soluții corecte la problemele care urmează în fiecare capitol.

Într-un organism cu un număr diploid de 6, câte structuri cromozomiale individuale se vor alinia la placa metafazică a (a) mitozei, (b) meiozei I și (c) meiozei II? Descrieți fiecare configurație.

Soluție: (a) În mitoză, unde cromozomii omologi nu fac sinapsă, vor exista 6 structuri duble, fiecare cu o pereche de cromatide surori. Numărul de structuri este echivalent cu numărul diploid.
(b) În meioza I, omologii se află în sinapsă, reducând numărul de structuri la 3. Fiecare dintre acestea se numește tetradă și este formată din două perechi de cromatide surori.
(c) În meioza II, există același număr de structuri (3), dar în acest caz se numesc diade. Fiecare diadă este formată dintr-o pereche de cromatide surori. Dacă a avut loc încrucișarea, fiecare cromatidă poate conține o parte dintr-una dintre cromatidele sale non-surori, ca urmare a schimbului din profaza I.

2. Ignorând încrucișarea, desenați toate configurațiile de aliniere posibile care pot apărea în timpul metafazei pentru cromozomii prezentați în Figura 2.11.

   Soluție: După cum se arată în diagrama de mai jos, există patru configurații posibile când *n = 2.*

3. Pentru cromozomii din problema anterioară, presupuneți că fiecare dintre cromozomii mai mari are o alelă diferită pentru o anumită genă, A sau *a,* așa cum se arată. Presupuneți, de asemenea, că fiecare dintre cromozomii mai mici are o alelă diferită pentru o a doua genă, *Bob.* Calculați probabilitatea generării fiecăreia dintre combinațiile posibile ale acestor alele *(AB, Ab, aB, ab)* după meioza I.

   Soluție: așa cum se arată în diagrama de la sfârșitul paginii: Cazul I *AB* și *ab*

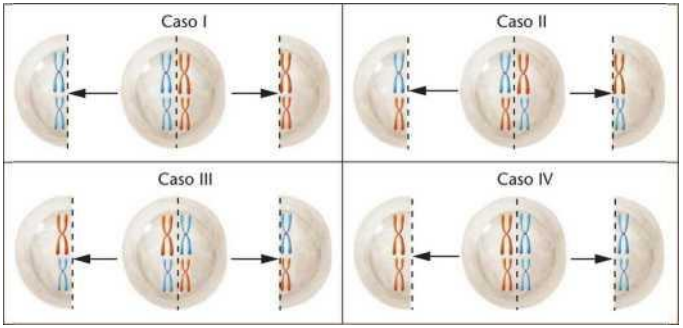
   Cazul II *Ab* și *aB*
   Cazul III *aB* și *Ab*
   Cazul IV *ab* și *AB*
   Total: *AB* = *2* (p = 1/4) *Ab* = 2 (p = 1/4) <iB = 2(p = 1/4) *ab* = *2(p* = 1/4)

4. Câte configurații cromozomiale diferite pot apărea după meioza I dacă există trei perechi diferite de cromozomi (n = 3)?

   Soluție: Dacă n = 3, atunci sunt posibile opt configurații diferite. Formula 2", unde *n* indică numărul haploid , ne permite să calculăm numărul de modele de aliniere potențiale . După cum vom vedea în capitolul următor, aceste modele apar ca o consecință a principiului *mendelian* al *segregării* și servesc drept bază *fizică* pentru un alt principiu mendelian, cel al segregației *independente* .

5. Descrieți compoziția unei tetrade meiotice în timpul profaza 1 , presupunând că nu a avut loc nicio încrucișare. Care ar fi consecințele unui singur eveniment de încrucișare în această structură?

   Soluție: O astfel de tetradă ar conține patru cromatide, formând două perechi. Membrii fiecărei perechi se numesc cromatide surori . Aceștia sunt ținuți împreună de un centromer comun . Membrii unei perechi provin de la mamă, în timp ce membrii celeilalte perechi provin de la tată. Membrii - paterni și materni se numesc cromatide non - surori . Un singur eveniment de crossing - over va duce la schimbul unei porțiuni dintr -o cromatidă paternă și maternă , producând o chiasmă, în care cele două cromatide implicate se suprapun fizic în tetradă. Procesul de schimb se numește - crossing over .



Solución para la cuestión 2

Solución para la cuestión 3

Problemas y preguntas para la discusión

DUPĂ CUM ȘTIM

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care sunt distribuiți cromozomii în timpul diviziunii celulare , atât pentru diviziunea celulară somatică (mitoză), cât și pentru diviziunea celulelor care produc gameți și spori (meioză). În același timp, am avut mai multe ocazii să examinăm metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Din explicațiile oferite în capitol,
   (a) De unde știm că cromozomii formează perechi omologe ?
   (b) De unde știm că replicarea ADN-ului are loc în interfază și nu într-o fază incipientă a mitozei ?
   (c) De unde știm că cromozomii mitotici sunt derivați din cromatină ?
2. Explicați rolul pe care îl joacă următoarele componente celulare în stocarea, exprimarea sau transmiterea informației genetice : (a) cromatină, (b) nucleol, (c) ribozom, (d) mitocondrii, (e) centriol, (f) centromer.
3. Discutați conceptele de cromozomi omologi, diploidie și haploidie. Ce caracteristici au în comun doi cromozomi considerați omologi?
4. Dacă doi cromozomi ai unei specii au aceeași lungime și centromerul este situat aproximativ în același loc, dar nu sunt omologi, ce îi diferențiază ?
5. Descrieți evenimentele care caracterizează fiecare etapă a mitozei.
6. Precizați denumirea atribuită diferitelor tipuri de cromozomi în funcție de poziția centromerului lor și indicați, de asemenea, unde se află centromerul în fiecare caz.
7. Comparați telofaza mitozei la plante și la animale.
8. Descrieți fazele ciclului celular și evenimentele care le caracterizează .
9. Comparați rezultatul final al meiozei cu cel al mitozei.
10. Definiți și discutați următorii termeni: (a) sinapsă, (b) bivală , (c) chiasmate, (d) încrucișare, (e) cromomeri, (f) cromatide surori, (g) tetrade, (h) diade și (i) monade.
11. Comparați conținutul genetic și originea cromatidelor surori cu cele ale cromatidelor non- surori la prima lor apariție în timpul profaza I a meiozei. Cum s-ar putea modifica conținutul genetic al acestor cromatide înainte ca tetradele să se alinieze la placa ecuatorială în timpul metafazei I?
12. Având în vedere rezultatele finale ale celor două tipuri de diviziune, de ce este necesar ca cromozomii omologi să se împerecheze în meioză și nedorit ca aceștia să se împerecheze în mitoză?
13. Comparați spermatogeneza și oogeneza. Care este semnificația formării corpilor polari ?
14. Explicați de ce meioza are ca rezultat o mare variație genetică, în timp ce mitoza nu.

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

O celulă diploidă are trei perechi de cromozomi omologi, denumiți Cl și C2, M1 și M2 și Sl și S2. Nu există încrucișare . Ce combinații posibile de cromozomi vor exista în (a) celulele fiice după mitoză ? (b) prima metafază meiotică ? (c) celulele haploide după cele două diviziuni meiotice?

16. Având în vedere problema de mai sus, precizați numărul de celule haploide diferite care ar putea fi produse prin meioză dacă s-ar adăuga o a patra pereche de cromozomi (W1 și W2) .
17. În ovogeneza unei specii animale cu un haplogrup de 6, o diadă suferă o non-disjuncție în timpul meiozei II . După a doua diviziune meiotică, diada în cauză este transferată intactă în ovul. Câți cromozomi sunt în (a) ovulul matur și (b) al doilea corp polar? (c) După fertilizarea cu un spermatozoid normal , ce situație cromozomială rezultă ?
18. Care este probabilitatea ca într -un organism cu un număr haploid egal cu 10, să se formeze un spermatozoid cu 10 cromozomi ai căror centromeri provin de la omologii materni ?
19. În prima profază meiotică, (a) când are loc crossing- over-ul ? (b) Când are loc sinapsisul ? (c) În timpul cărei faze cromozomii vor fi cel mai puțin condensați?
   (d) Când vor deveni chiasmatele vizibile pentru prima dată ?
20. Descrieți rolul meiozei în ciclul de viață al unei plante superioare .
21. Comparați o fibră de cromatină cu un cromozom mitotic. Care este legătura dintre aceste două structuri?
22. Descrieți modelul de „fibră pliată" al cromozomilor mitotici .
23. Vi se oferă o preparație de cromozomi în metafază de la un organism necunoscut care are 12 cromozomi. Doi, care sunt evident mai mici decât restul , par identici ca lungime și poziție a centromerului . Descrieți tot ce puteți despre acești cromozomi.
24. Dacă urmărim 50 de ovocite primare la un animal prin diferitele etape ale ovogenezei , câte ovocite secundare se vor forma? Câte corpi polari primi se vor forma? Câte ootide se vor forma? Dacă urmărim 50 de spermatocite primare la un animal prin diferitele etape ale spermatogenezei , câte spermatocite secundare se vor forma? Câte spermatide se vor forma?
25. Conținutul de ADN nuclear al unui singur spermatozoid la *Drosophila melanogaster este* de aproximativ 0,18 picograme. Care este conținutul așteptat de ADN nuclear într- un spermatocit primar de *Drosophila?* Care este conținutul așteptat de ADN nuclear al unei celule somatice (o celulă non- sexuală) în faza G1 ? Care este conținutul așteptat de ADN nuclear al unei celule somatice în timpul metafazei?

Problemas extrapicantes

Ca parte a secțiunii „Probleme și întrebări pentru discuții", vom prezenta, în acest capitol și în următoarele, una sau mai multe probleme genetice „extra-fierbinți". Am ales să separăm aceste probleme pentru a le evidenția pe cele care sunt deosebit de dificile. Vi se poate cere să examinați și să evaluați date reale, să proiectați experimente genetice sau să întreprindeți un proiect de învățare cooperativă. La fel ca în cazul soiurilor genetice de ardei, unele dintre aceste experiențe vor fi puțin picante, iar altele vor fi foarte picante. Dar sperăm să vă bucurați de provocările pe care le prezintă.

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

Pentru întrebările 26-31, luați în considerare o celulă diploidă cu trei perechi de cromozomi, AA, BB și CC. Fiecare pereche are un membru patern și unul matern (de exemplu, Am ^{si}Ap $^{)}$. Folosind această nomenclatură, demonstrați-vă înțelegerea mitozei și meiozei desenând combinațiile solicitate de cromatide . Asigurați - vă că indicați dacă cromatidele sunt împerecheate ca urmare a duplicării și / sau sinapsei . Puteți folosi hârtie mare și lucra cu un partener pentru a rezolva aceste probleme. Recomandăm învățarea cooperativă ca o modalitate eficientă de a dezvolta abilitățile de care veți avea nevoie pentru a rezolva problemele prezentate în tot textul .

26. Ce combinație sau combinații de cromatide vor apărea în metafaza mitozei ? Ce combinație sau combinații vor apărea la fiecare pol la sfârșitul anafazei ?
27. În meioza I, presupunând că nu există încrucișare, ce combinație sau combinații de cromatide vor exista la sfârșitul profazei ? Desenați toate alinierile posibile ale cromatidelor atunci când migrarea începe la începutul anafazei .
28. Există alte combinații posibile în profaza sistolice II la mijloc , altele decât cele pe care le-ați desenat în problema 27? Dacă da, desenați - le.
29 Desenați toate combinațiile posibile de cromatide la începutul anafazei în meioza II .
30 Să presupunem că în timpul meiozei I niciunul dintre cromozomii C nu se separă în timpul metafazei , ci în schimb se separă în diade (în loc de monade) în timpul meiozei II. Cum ar schimba acest lucru alinierile pe care le- ați desenat pentru anafazele meiozei I și II? Desenați-le.
31. Să presupunem că fiecare gamet produs în problema 30 participă la fertilizarea unui gamet haploid normal . Ce combinații vor apărea? Ce procent de zigoți vor fi diploizi, cu un membru patern și unul matern din fiecare pereche de cromozomi?
32. O specie de cereală, secara *(Secale cereale)* are un număr de cromozomi de 14, în timp ce o specie de iarbă canadiană *(Elymus canadensis)* are un număr de cromozomi de 28. Hibrizi sterili pot fi produși prin încrucișarea *Secale* cu *Elymus.*

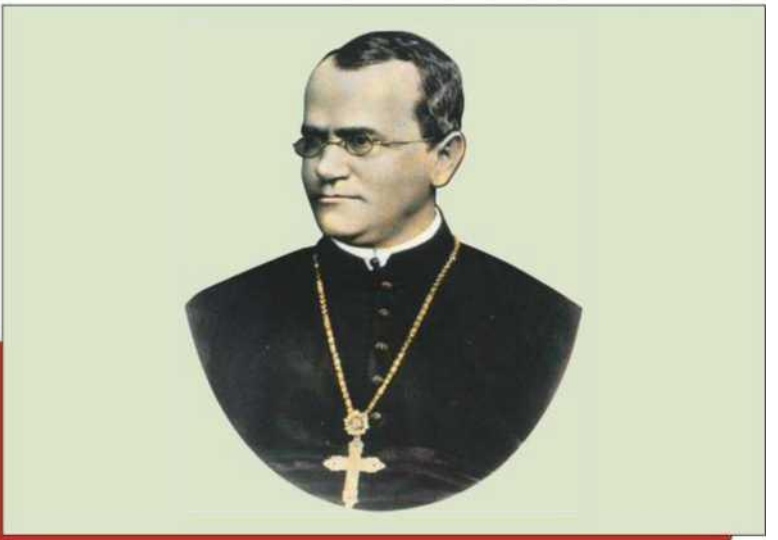
(a) Care ar fi numărul așteptat de cromozomi în celulele somatice ale hibrizilor?
(b) Având în vedere că niciunul dintre cromozomi nu se împerechează în timpul meiozei I la hibridul steril (Hang și Franckowlak, 1984), ce am putea concluziona despre modelele de separare a acestor cromozomi în timpul anafazei I?

O procedură interesantă a fost aplicată pentru evaluarea echilibrului cromozomial al ovocitelor secundare potențiale pentru utilizare în fertilizarea *in vitro* la oameni. Folosind tehnica FISH, sau *hibridizarea fluorescentă in situ,* Kuliev și Verlinsky (2004) au reușit să identifice cromozomi individuali în primii corpi polari și astfel să deducă compoziția cromozomială a ovocitelor „surori".

(a) Să presupunem că, examinând un prim corp polar, observăm că acesta are o copie (diadă) a fiecărui cromozom, dar două diade ale cromozomului 21. Ce complement ne-am aștepta să fie în ovocitul secundar? Ce consecințe ar suferi zigotul rezultat dacă ovocitul secundar ar fi fertilizat?
(b) Să presupunem că examinăm un prim corp polar și observăm că acesta are câte o copie (diadă) a fiecărui cromozom, cu excepția cromozomului 21, care este complet absent. Ce ne-am aștepta să fie complementul cromozomului 21 (doar în ceea ce privește cromozomul 21) în ovocitul secundar? Ce consecințe ar suferi probabil zigotul rezultat dacă ovocitul secundar ar fi fertilizat ?
(c) și Verlinsky au afirmat că a existat un număr relativ mare de erori de segregare în timpul meiozei I. În aceste cazuri, centromerul a suferit o diviziune prematură, care a avut loc în timpul meiozei I mai degrabă decât în miezoza II. În ceea ce privește cromozomul 21 , care ar fi complementul cromozomului 21 în ovocitul secundar dacă am observa o singură cromatidă (monadă) pentru cromozomul 21 în primul corp polar? Dacă am folosi acest ovocit secundar pentru fertilizare, care ar fi consecințele așteptate ?

33.

Gregor Johann Mendel, que en 1866 desarrolló los principales postulados de la genética de la transmisión, gracias a sus experimentos con guisantes de jardín.



3

Genetica mendeliană

CONCEPTE CAPITOL

H Moștenirea depinde de informațiile stocate în factori discreți numiți gene.

►► Genele sunt transmise din generație în generație prin intermediul unor vehicule numite cromozomi.

H Cromozomii, care formează perechi în organismele diploide, oferă baza moștenirii biparentale.

►► În formarea gameților, cromozomii sunt distribuiți conform postulatelor descrise pentru prima dată de Gregor Mendel în secolul al XIX-lea, pe baza cercetărilor sale asupra mazărei de grădină.

►► Postulatele mendeliene indică faptul că cromozomii omologi se separă unii de alții și se asociază independent cu alți omologi segreganți în formarea gameților .

►► Proporțiile genetice, exprimate ca probabilități, sunt supuse unor abateri aleatorii și pot fi evaluate statistic.

►► Analiza arborilor genealogici permite formularea de predicții privind natura genetică a trăsăturilor umane.

Și deși moștenirea caracteristicilor biologice
Acest lucru este recunoscut de mii de ani,

Prima idee importantă despre mecanismul *J*■" implicat a fost lansată acum aproape 145 de ani. În 1866, Gregor Johann Mendel a publicat rezultatele unei serii de experimente care au pus bazele geneticii ca disciplină formală. Munca lui Mendel a trecut în mare parte neobservată până la începutul secolului al XX-lea, dar a stabilit în cele din urmă conceptul de genă ca unitate discretă a eredității. De atunci, am reușit să clarificăm modul în care genele , care sunt segmente de cromozomi, sunt transmise urmașilor și controlează trăsăturile. Cercetările au continuat neîncetat pe tot parcursul secolului al XX-lea. De fapt, studiile de genetică și, mai recent, cele la nivel molecular, au rămas în avangarda cercetării biologice de la începutul secolului al XX-lea.

Când Mendel și-a început studiile asupra eredității folosind *Pisum sativum,* Înainte de descoperirea mazărei de grădină, existența cromozomilor , rolul și mecanismul meiozei erau necunoscute . Cu toate acestea , Mendel a reușit să determine existența unor *unități discrete de moștenire și să prezică comportamentul acestora în timpul formării gameților. Ulterior* , cercetătorii, având acces la date citologice, au putut să-și coreleze propriile observații privind comportamentul cromozomilor în meioză cu principiile moștenirii ale lui Mendel. Odată stabilită această corelație, postulatele lui Mendel au fost acceptate ca bază pentru studiul a ceea ce este cunoscut sub numele de genetică mendeliană sau genetica moștenirii . Aceste principii descriu modul în care genele sunt transmise de la părinți la urmași și derivă direct din experimentele lui Mendel . Chiar și astăzi, ele constituie piatra de temelie a studiilor de ereditate . În acest capitol, ne vom concentra pe dezvoltarea principiilor lui Mendel .

3.1

Mendel a folosit un model experimental pentru a aborda studiul tiparelor de moștenire

■

Johann Mendel s-a născut în 1822 într-o familie de țărani din satul Heinzendorf din Europa Centrală. Un elev excelent în școala secundară, Mendel a studiat ulterior filosofia timp de mai mulți ani și a fost admis în 1843 la mănăstirea augustiniană Sfântul Toma din Brno, acum parte a Republicii Cehe. Ca călugăr, a luat numele Gregor. În 1849, a fost eliberat din îndatoririle sale pastorale și, între 1851 și 1853, a urmat cursurile Universității din Viena, unde a studiat fizica și botanica. S-a întors la Brno în 1854, unde, în următorii 16 ani, a predat fizica și științele naturii. Mendel a primit sprijin din partea mănăstirii pentru studiile și cercetările sale de-a lungul vieții.

În 1856, Mendel a efectuat prima sa serie de experimente de - hibridizare cu mazărea de grădină, începând astfel faza de cercetare a carierei sale . Experimentele sale au continuat până în 1868, când a fost ales stareț al mănăstirii. Deși interesul său pentru genetică a rămas, noile sale responsabilități i-au ocupat aproape tot timpul. Mendel a murit de o boală de rinichi în 1884. Ziarul local i-a adus următorul omagiu:

> „Moartea sa i-a lipsit pe săraci de un binefăcător și de umanitatea unui om cu cel mai nobil caracter, care a fost un prieten cald, un promotor al științelor naturale și un preot exemplar."

Mendel a publicat pentru prima dată rezultatele unor încrucișări genetice simple efectuate între anumite soiuri de mazăre în 1865. Deși nu a fost primul care a încercat să ofere dovezi experimentale ale moștenirii genetice , succesul lui Mendel acolo unde alții eșuaseră poate fi atribuit, cel puțin parțial, modelului său elegant de design experimental și analitic.

Mendel a demonstrat o perspectivă vastă asupra metodologiei - necesare pentru o biologie experimentală solidă. Mai întâi , a ales un organism ușor de cultivat și care putea fi hibridizat manual. În natură, planta de mazăre se autofertilizează , dar fertilizarea încrucișată este ușor de efectuat experimental. Se reproduce bine și crește până la maturitate într-un singur sezon. Apoi, Mendel a decis să controleze șapte caracteristici vizibile, fiecare dintre acestea fiind reprezentată de două trăsături alternative sau caractere (Figura 3.1). De exemplu, pentru trăsătura înălțimii tulpinii, a experimentat cu *plante înalte* și pitice. A selectat alte șase perechi de trăsături alternative care au afectat forma și culoarea semințelor , forma și culoarea păstăilor și culoarea și poziția florilor . Mendel a obținut o serie de soiuri pure de la comercianții locali de semințe , în care fiecare trăsătură a rămas neschimbată de la o generație la alta prin autofertilizare.

Pe lângă alegerea organismului potrivit, la succesul lui Mendel au contribuit și alți factori. El și-a limitat analiza la una sau foarte puține perechi de trăsături alternative în fiecare experiment. De asemenea, a avut mare grijă să înregistreze datele cantitativ , lucru esențial în experimentele genetice. Din analiza datelor sale , Mendel a dedus anumite postulate care au devenit principiile geneticii ereditare .

Rezultatele experimentelor lui Mendel nu au fost apreciate decât la începutul secolului al XX-lea, destul de mult mai târziu.

Carácter	Caracteres alternativos		Resultados en F,	Resultados en F2	Proporción 1 en F_2
Forma de la semilla	redondo/rugoso		todas redondas	5.474 redondas 1.850 rugosas	2,96:1
Color de la semilla	amarillo/verde		todas amarillas	6.022 amarillas 2.001 verdes	3,01:1
Forma la de vaina	hinchado/arrugado		todas hinchadas	882 hinchadas 299 arrugadas	2,95:1
Color de la vaina	verde/amarillo		todas verdes	428 verdes 152 amarillas	2,82:1
Color de la flor	violeta/blanco		todas violeta	705 violetas 224 blancas	3,15:1
Posición de la flor	axial/terminal		todas axiales	651 axiales 207 terminales	3,14:1
Longitud del tallo	alto/enano		todos altos	787 altos 277 enanos	2,84:1

FIGURA 3.1 Los siete pares de caracteres alternativos y los resultados de los siete cruces monohíbridos de Mendel con el guisante de jardín *(Pisum sativum).* En cada caso, se utilizó el polen proveniente de plantas que manifestaban uno de los caracteres para fecundar al óvulo de plantas que manifestaban el otro carácter. En la generación F„ todas las plantas manifestaban uno de los dos caracteres. El carácter alternativo reaparecía luego, aproximadamente en la cuarta parte de las plantas F_2.

morții sale. Odată ce publicațiile lui Mendel au fost redescoperite de geneticienii care investigau funcția și comportamentul - cromozomilor, implicațiile postulatelor sale au devenit imediat clare. El descoperise baza transmiterii trăsăturilor ereditare!

3.2

Încrucișarea monohibridă dezvăluie modul în care o trăsătură este transmisă din generație în generație

Cele mai simple încrucișări efectuate de Mendel au implicat o singură pereche de trăsături alternative. Fiecare dintre aceste experimente se numește încrucișare monohibridă. O încrucișare monohibridă se realizează prin încrucișarea indivizilor din două soiuri parentale , fiecare dintre acestea prezentând una dintre cele două forme alternative ale trăsăturii studiate. Examinăm mai întâi prima generație de urmași dintr - o astfel de încrucișare și apoi luăm în considerare urmașii indivizilor autofecundați din această primă - generație. Părinții sunt numiți P, sau generația parentală; urmașii lor sunt F , sau prima generație filială ; iar indivizii rezultați din autofecundarea F sunt F2 . FIE filială de a doua generație.

și pitică de rasă pură este foarte reprezentativă pentru încrucișările monohibride ale lui Mendel. Plantele înalte *și* pitice *sunt* forme sau caracteristici alternative ale trăsăturii de înălțime a tulpinii. Cu excepția cazului în care plantele înalte sau pitice sunt încrucișate între ele sau cu o altă varietate, acestea se vor autofecunda și își vor menține puritatea , transmițându-și trăsătura din generație în generație. Cu toate acestea, atunci când Mendel a încrucișat plante înalte cu plante pitice, urmașii au fost doar plante înalte. Când a permis membrilor F1 să se autofecundeze, Mendel a observat că 787 din cele 1.064 de plante F2 erau înalte și 277 erau pitice . Rețineți că în această încrucișare (Figura 3.1) , trăsătura de pitic dispare în F1 , doar pentru a reapărea în generația F2 . Aceste observații au fost

foarte importante pentru analiza ulterioară a lui Mendel asupra încrucișărilor monohibride .

Datele genetice sunt de obicei exprimate și analizate sub formă de rapoarte. În acest exemplu particular, au fost efectuate multe încrucișări P1 identice , rezultând numeroase plante F2 - toate înalte. Dintre cei 1.064 de urmași F2 , 787 au fost înalți și 277 au fost pitici, un raport aproximativ de 2,8:1,0, sau aproximativ 3 :1.

Mendel a efectuat încrucișări similare între plante de mazăre , fiecare exprimând una dintre celelalte perechi de trăsături alternative. Rezultatele acestor încrucișări sunt prezentate în Figura 3.1. În toate cazurile, rezultatul a fost similar cu cel al încrucișării înalt/pitic tocmai descrisă . Pentru trăsătura de interes, toți urmașii F1 au avut aceeași trăsătură prezentată de unul dintre părinți , în timp ce la urmașii F2 s-a obținut un raport aproximativ de 3:1 . Adică, trei sferturi semănau cu plantele F1 , în timp ce un sfert exprima trăsătura alternativă, care dispăruse în generația F2.

Este important de menționat un alt aspect al încrucișărilor monohibride. În fiecare încrucișare, modelele de moștenire ale F1 și F2 au fost similare, indiferent de care plantă (Pj) fusese sursa polenului (spermatozoidului) și care fusese sursa ovulului . Încrucișările puteau fi efectuate în ambele direcții - adică, polenul de la planta înaltă polenizează plante pitice sau invers . Aceste încrucișări care pot fi efectuate în ambele direcții se numesc încrucișări reciproce. Prin urmare, rezultatele încrucișărilor monohibride ale lui Mendel nu au fost dependente de sex.

Pentru a explica aceste rezultate, Mendel a propus existența unor factori *discreți* pentru fiecare trăsătură. El a sugerat că acești factori erau unitățile de bază ale eredității și erau transmiși neschimbați din generație în generație, determinând diferitele trăsături exprimate de fiecare plantă. Folosind aceste idei de bază, Mendel a formulat ipoteze precise despre modul în care astfel de factori ar putea explica rezultatele încrucișărilor monohibride.

Primele trei principii ale lui Mendel

Luând în considerare tiparele consistente ale rezultatelor încrucișărilor monohibride , Mendel a dedus următoarele trei *postulate* sau principii ale moștenirii .

1. FACTORI ÎN CUPLU

Trăsăturile genetice sunt controlate de factori care apar în perechi în fiecare organism.

Într-o încrucișare monohibridă între plante înalte și plante pitice, fiecare trăsătură are un factor specific. Fiecare individ diploid primește câte un factor de la fiecare părinte. Deoarece factorii apar în perechi, sunt posibile trei combinații: doi factori pentru înălțime normală, doi factori pentru nanism sau câte un factor de fiecare tip. Fiecare individ posedă una dintre aceste trei combinații, care îi determină înălțimea tulpinii .

2. DOMINANȚĂ/RECESIVITATE

la un individ se găsesc doi factori diferiți, responsabili pentru un anumit caracter , unul dintre factori domină asupra celuilalt, ceea ce se numește recesiv.

În fiecare încrucișare monohibridă , trăsătura exprimată în generația F1 Aceasta este o consecință a prezenței factorului dominant. Trăsătura care nu este exprimată în F1, dar reapare în F2 , se află sub influența genetică a factorului recesiv . Termenii *dominant* și *recesiv* De asemenea, sunt folosite pentru a desemna trăsăturile corespunzătoare . În acest caz, trăsătura de tulpină înaltă este dominantă , iar trăsătura de tulpină pitică este recesivă.

3. SEGREGARE

În formarea gameților , factorii perechi se separă sau segregă aleatoriu , astfel încât fiecare gamet primește unul sau altul cu probabilitate egală .

Dacă un individ conține doi factori identici (de exemplu, cei pentru tulpina înaltă), atunci toți gameții săi vor primi un factor de același tip (în acest caz, tulpina înaltă). Dacă un individ conține doi factori diferiți (de exemplu , unul pentru tulpina înaltă și unul pentru tulpina pitică), atunci fiecare gamet are o șansă de 50% de a primi factorul corespunzător fie tulpinii înalte , fie tulpinii pitice.

Aceste postulate oferă o explicație adecvată pentru rezultatele încrucișărilor monohibride . Să folosim încrucișarea plantelor înalte /pitice pentru a ilustra acest lucru. Mendel a argumentat că plantele înalte (P_1) aveau o pereche de factori identici, la fel ca și plantele pitice (P_2). Toți gameții plantelor înalte au primit un factor înalt ca o consecință a segregării. În mod similar, toți gameții plantelor pitice au primit un factor pitic . După fertilizare , toate plantele F_1 au primit câte un factor de la fiecare părinte, un factor înalt de la unul și un factor pitic de la celălalt, restabilind astfel perechea. Dar, deoarece plantele înalte sunt dominante față de cele pitice , toate plantele F_1 au fost înalte.

Când plantele F1 formează gameți, principiul *segregării* impune ca fiecare gamet să primească, aleatoriu, fie Factorul înalt , *sau* piticul . Odată ce fertilizarea aleatorie a avut loc în autofertilizarea lui F_t , se vor forma patru combinații în F_2 . cu frecvență egală:

1. înalt/înalt
2. înalt/pitic
3. pitic/micuț
4. pitic

Combinațiile (1) și (4) vor avea ca rezultat în mod clar plante înalte, respectiv pitice. Conform principiului dominanței/recesivității, combinațiile (2) și (3) vor produce plante înalte. Prin urmare, putem prezice că generația F1 constă din trei sferturi plante înalte și un sfert plante pitice, un raport de 3:1. Aceasta este aproximativ ceea ce Mendel a observat în încrucișările dintre plante înalte și pitice. Un model similar a fost observat în fiecare dintre celelalte încrucișări monohibride (Figura 3.1).

Terminologia genetică actuală

Pentru a analiza încrucișarea monohibridă și primele trei principii ale lui Mendel într-un context modern, trebuie să introducem câțiva termeni noi și o serie de simboluri pentru factori. Trăsături precum înalt sau pitic sunt expresii vizibile ale informațiilor transmise de factori. De acum înainte, ne vom referi la aspectul fizic al unei trăsături ca fiind fenotipul individului. Toți factorii lui Mendel sunt unități de ereditate numite gene de către geneticienii moderni. Pentru orice trăsătură dată, cum ar fi înălțimea plantei , fenotipul este determinat de prezența unor forme alternative ale aceleiași gene, numite alele . De exemplu, factorii care determină trăsăturile înalt și pitic sunt alelele care determină înălțimea plantei de mazăre.

Geneticienii folosesc diverse convenții pentru atribuirea de simboluri genelor. Vom trece în revistă câteva dintre acestea în Capitolul 4 , dar deocamdată vom adopta una pe care o putem folosi în mod constant pe parcursul acestui capitol. Conform acestei convenții, vom lua prima literă a trăsăturii recesive pentru a simboliza trăsătura în cauză. Litera italic minusculă desemnează alela trăsăturii recesive, iar litera italic majusculă desemnează alela trăsăturii dominante. Astfel, pentru plantele de mazăre Mendel , vom lua *e* pentru a desemna alela pitică și E pentru a reprezenta alela înaltă. Când alelele sunt scrise în perechi pentru a reprezenta cei doi factori prezenți la orice individ (EE, Ee sau ee), simbolul rezultat se numește genotip. Genotipul desemnează structura genetică a unui individ pentru trăsătura sau trăsăturile pe care le descrie, indiferent dacă individul este haploid sau diploid. Citind genotipul, putem determina fenotipul individului: *EE* și *Ee* sunt înalți, în timp ce *ee* este pitic. Când ambele alele sunt identice (EE sau *ee),* individul se numește homozigot pentru trăsătura respectivă ; când alelele sunt diferite (Ee), folosim termenul heterozigot. Figura 3.2 ilustrează încrucișarea monohibridă completă , folosind aceste simboluri și termeni.

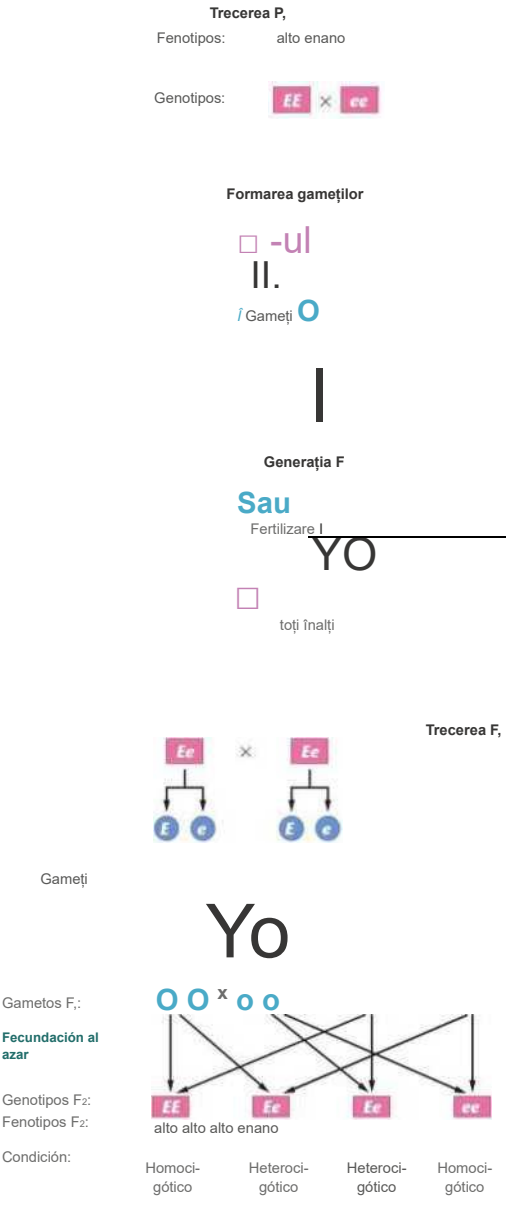


FIGURA 3.2 El cruce monohíbrido entre plantas de guisante altas (E) y enanas (e). Todos los individuos se muestran dentro de un rectángulo, y los gametos dentro de un círculo.

Generația F $_2$

ACUM REZOLVĂ ASTA

3.1 Porumbeii pot prezenta un model în carouri sau solid. Într-o serie de încrucișări controlate, s-au obținut următoarele date:

		Pui F,	simplu în carouri
(a)	carouri X carouri		360
(b)	carouri X simplu		380
Cruce P,	(c)		neted X neted 035

Apoi, urmașii F au fost încrucișați selectiv, cu următoarele rezultate. (Încrucișarea P, care a dus la puii Fv , este indicată între paranteze)

Cruci F, X , F	Descendenți F2 Carouri	Netezi
(d) în carouri (a) X simplu (c)	34	0
(e) în carouri (b) simplu X (c)	17 ani	14
(f) carouri (b)	28 de ani	9
(g) în carouri (a)	39	0

Cum se moștenesc modelele în carouri și simple? Selectați și definiți simbolurile pentru genele implicate și determinați genotipurile părinților și urmașilor din fiecare încrucișare.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea modului în care trăsăturile sunt moștenite și transmise urmașilor. Cheia rezolvării acesteia este de a determina mai întâi dacă sunt implicate mai multe perechi de gene, convertind datele în rapoarte caracteristice încrucișărilor Mendel. În această problemă, încercați să vedeți dacă vreunul dintre rapoartele F2 se încadrează în raportul monohibrid 3:1 al lui Mendel.*

Abordarea analitică a lui Mendel

Ce l-a determinat pe Mendel să deducă faptul că factorii există în perechi? Întrucât existau două trăsături alternative pentru fiecare caracteristică, părea logic să existe doi factori distincți . Totuși, de ce dispare una dintre trăsături, sau fenotipuri, în generația F1? Observarea generației F2 ajută la răspunsul la această întrebare. Trăsătura recesivă și factorul său nu dispar de fapt în F1; ele sunt pur și simplu ascunse sau mascate, doar pentru a reapărea mai târziu, într-un sfert din generația F2 . În consecință, Mendel a concluzionat că fiecare individ F1 a primit un factor pentru înălțime și unul pentru nanism; dar pentru că factorul înalt, sau alela, este dominant față de factorul pitic, sau alela, toate plantele F1 sunt înalte. Având în vedere aceste informații, ne putem întreba cum a explicat Mendel raportul 3:1 în F1. După cum se arată în Figura 3.2, Mendel a dedus că alelele înalte și pitice ale heterozigoților p! se separă aleatoriu în gameți. Dacă fertilizarea este aleatorie, acest raport este prezis . Dacă se produce un număr mare de urmași , rezultatul unei astfel de încrucișări va reflecta raportul de 3:1.

Deoarece Mendel a lucrat fără cunoștințele prealabile de care se bucură geneticienii astăzi, raționamentul său analitic trebuie considerat o realizare științifică cu adevărat remarcabilă. Bazându-se pe experimente de încrucișare relativ simple , dar realizate cu atenție , el nu numai că a propus existența unor unități discrete de ereditate , dar a explicat și modul în care acestea sunt transmise de la o generație la alta !

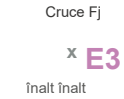
Piața Punnett

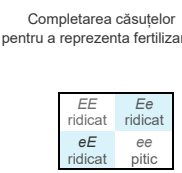
Genotipurile și fenotipurile rezultate din combinarea gameților în timpul fertilizării pot fi ușor vizualizate prin construirea unui pătrat Punnett, numit după primul său inventator , Reginald C. Punnett. Figura 3.3 ilustrează această metodă de analiză pentru încrucișarea monohibridă F_t x</sub>F_j . Fiecare gamet posibil este plasat într -o coloană sau un rând, coloanele reprezentând gameții mamei , iar rândurile reprezentându-i pe cei ai tatălui. După atribuirea gameților rândurilor și coloanelor, putem prezice următoarea generație introducând informațiile gametice masculine și feminine în fiecare pătrat, producând astfel toate - genotipurile posibile . Prin completarea pătratului Punnett, enumerăm , în esență, toate evenimentele aleatorii de fertilizare posibile . Genotipurile și fenotipurile tuturor urmașilor posibili sunt determinate prin citirea combinațiilor inserate în pătrate .

Metoda pătratului Punnett este utilă în special atunci când începi să înveți genetică și rezolvarea problemelor . Observați cât de ușor este să deduci raporturile fenotipice 3:1 și genotipice 1:2:1 în generația F2 din Figura 3.3.

Crucea de testare: un personaj

Se preconizează că se vor produce plante înalte în F2. Acestea - prezintă genotipurile *EE sau Ee* . Există vreo modalitate de a afla genotipul unei plante care exprimă fenotipul dominant ? Mendel a conceput o metodă destul de simplă, care este încă utilizată în experimentele de ameliorare a animalelor și plantelor : încrucișarea de testare . Organismul cu fenotipul dominant , dar genotip necunoscut, este încrucișat cu un *individ* homozigot *recesiv* . De exemplu, *așa cum* se arată în Figura 3.4 (a), dacă o plantă înaltă de genotip EE este încrucișată cu o plantă pitică, care are genotipul ee , Toți urmașii vor fi fenotipic înalți și genotipic Ee . Totuși, așa cum se arată în Figura 3.4(b), dacă o plantă înaltă (*Ee*) este încrucișată cu o plantă pitică (ee), atunci jumătate din urmași vor fi înalți (Ee) , iar cealaltă jumătate pitici (ee). Prin urmare, o





Rezultate F2

Genotip	Fenotip
1 *EE*	ridic at
2 *Ee*	
1 ee	ZI - 1/4 pitic

FIGURA 3.3 Utilizarea unui pătrat Punnett pentru a genera proporțiile F2 ale crucii F, X F , prezentate în Figura 3.2.

Raportul 1:1 înalt/pitic demonstrează natura heterozigotă a plantei înalte cu genotip necunoscut. Rezultatul încrucișării de testare întărește concluzia lui Mendel că trăsăturile sunt controlate de diferiți factori.

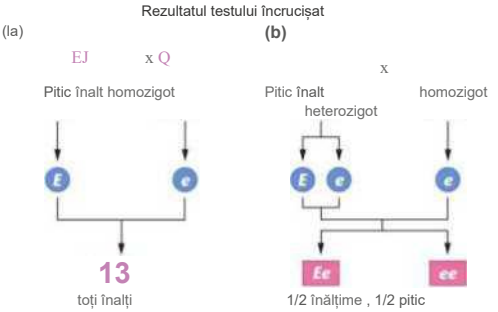


FIGURA 3.4 Încrucișare de testare pentru o singură trăsătură. În (a) părintele înalt este homozigot. În (b) părintele înalt este heterozigot. Genotipul fiecărui părinte înalt poate fi determinat prin examinarea urmașilor încrucișării cu o plantă pitică recesivă homozigotă.

3.3

Încrucișarea dihibridă a lui Mendel generează un raport F2 distinctiv

Ca o extensie logică a încrucișărilor monohibride, Mendel a conceput și experimente în care două trăsături au fost examinate simultan. O astfel de încrucișare, care implică două perechi de trăsături alternative , se numește **încrucișare dihibridă** sau *încrucișare cu doi factori* . De exemplu, dacă plante de mazăre cu semințe rotunde, galbene sunt încrucișate cu plante cu semințe verzi , ridate , vor apărea rezultatele prezentate în Figura 3.5: toți urmașii F1 vor avea semințe rotunde, galbene . Prin urmare, este evident că galbenul este dominant față de verde și că rotundul este dominant față de ridat. În această încrucișare dihibridă, dacă indivizii F1 sunt lăsați să se autofecundeze, aproximativ 9/16 dintre plantele F1 vor exprima trăsăturile galbene și rotunde , 3/16 galbene și ridate, 3/16 verzi și rotunde și 1/16 verzi și ridate .

Figura 3.5 prezintă , de asemenea, o variantă a acestei încrucișări. În loc să se încrucișeze un părinte P1 care prezintă trăsăturile dominante (galben, rotund) cu unul care prezintă trăsăturile recesive (verde, ridat), plantele cu semințe galbene, ridate sunt încrucișate cu plante cu semințe verzi , rotunde . În ciuda schimbării fenotipurilor lui P1 , rezultatele sunt încă pozitive. Atât F, cât și F2 dau aceleași rezultate ca înainte. Motivul pentru aceasta va deveni clar în secțiunea următoare .

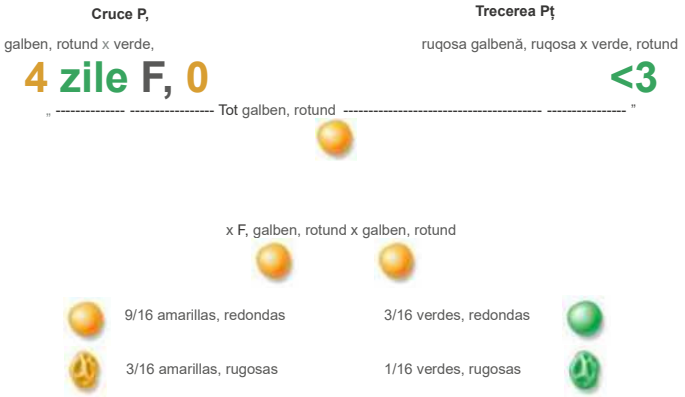


FIGURA 3.5 Rezultatele în F și în F 2 ale încrucișării dihibride mendeliene între semințe de mazăre galbene și rotunde cu unele verzi și ridate (stânga sus), precum și între semințe de mazăre galbene și ridate cu unele verzi și rotunde (dreapta sus).

Al patrulea postulat al lui Mendel: segregarea independentă

Putem înțelege mai ușor rezultatele unei încrucișări dihibride dacă o considerăm compusă teoretic din două încrucișări monohibride independente. Gândiți-vă la cele două seturi de trăsături ca fiind moștenite independent unul de celălalt; adică, probabilitatea ca o anumită plantă să aibă semințe galbene sau verzi nu este deloc influențată de probabilitatea ca acea plantă să aibă semințe rotunde sau ridate. Astfel, deoarece galbenul este dominant asupra verdelui, toate plantele F1 din această primă încrucișare teoretică vor avea semințe galbene. În a doua încrucișare teoretică, toate plantele F1 vor avea semințe rotunde, deoarece rotundul este dominant asupra ridatei. Când Mendel a examinat plantele F1 din încrucișarea dihibridă, acestea erau toate galbene și rotunde, exact așa cum sugerează încrucișarea noastră teoretică.

Rezultatele așteptate în F2 Prima încrucișare produce 3/4 semințe galbene și 1/4 semințe verzi . În mod similar, a doua încrucișare ar produce 3/4 semințe rotunde și 1/4 semințe ridate . Figura 3.5 arată că în încrucișarea dihibridă, 12/16 din toate semințele F2 Sunt galbene, iar 4/16 sunt verzi, prezentând raportul de 3:1 (3/4:1/4). În mod similar , 12/16 dintre semințele F1 sunt rotunde, iar 4/16 sunt rugoase, prezentând din nou raportul de 3:1.

Aceste rezultate demonstrează că cele două perechi de trăsături alternative sunt moștenite independent, astfel încât putem prezice frecvențele tuturor fenotipurilor F posibile aplicând legea produsului probabilităților : atunci când două *evenimente independente au loc simultan , probabilitatea comună rezultată este egală cu produsul probabilităților fiecăruia dintre ele.* De exemplu , probabilitatea ca o sămânță F2 să fie galbenă /rotundă este (3/4)(3/4) sau 9/16, deoarece 3/4 din toate semințele F2 trebuie să fie galbene și 3/4 din toate semințele F trebuie să fie rotunde .

Probabilitatea celorlalte trei fenotipuri F poate fi calculată similar : galben (3/4) *și* brut (1/4) trebuie să fie prezente împreună în 3/16 din cazuri; verde (1/4) *și* rotund (3/4) 3/16 din timp ; și verde (1/4) *și* rugos (1/4) 1/16 din timp . Aceste calcule sunt prezentate în Figura 3.6.

Devine clar de ce rezultatele lui Fj și F2 Sunt identici dacă părinții încrucișării inițiale sunt galbeni și rotunzi cu verde și ridați, sau dacă sunt galbeni și ridați cu verde și rotunzi . În ambele încrucișări , genotipul F1 al tuturor plantelor este identic. Prin urmare , generația F2 Este identic și la ambele intersecții.

Pe baza unor rezultate similare obținute în numeroase încrucișări dihibride , Mendel a propus un al patrulea principiu:

4. TRANSMISIE INDEPENDENTĂ

În formarea gameților , perechile de factori care sunt segregați se transmit independent unul de celălalt.

Acest principiu stipulează că segregarea oricărei perechi de factori are loc independent de oricare alta . Ca o consecință a segregării aleatorii ,

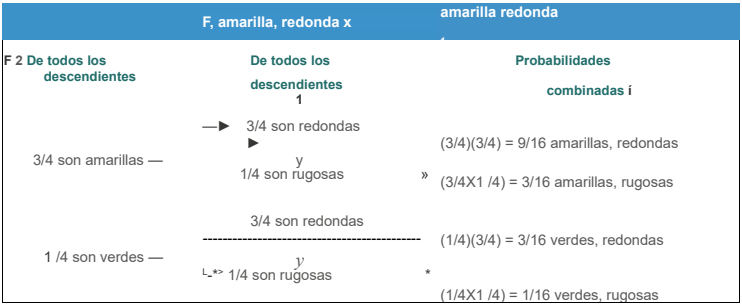

F, amarilla, redonda x
amarilla redonda
F 2 De todos los descendientes
De todos los descendientes 1
Probabilidades combinadas í
3/4 son amarillas —
—► 3/4 son redondas
► y 1/4 son rugosas
» (3/4)(3/4) = 9/16 amarillas, redondas
(3/4X1 /4) = 3/16 amarillas, rugosas
1 /4 son verdes —
3/4 son redondas
y 1/4 son rugosas
(1/4)(3/4) = 3/16 verdes, redondas
(1/4X1 /4) = 1/16 verdes, rugosas

FIGURA 3.6 Cálculo de las probabilidades combinadas de cada fenotipo F, para dos caracteres que se heredan independientemente. La probabilidad de que cada planta lleve semillas amarillas o verdes es independiente de la probabilidad de que lleve semillas redondas o rugosas.

Fiecare gamet primește câte un membru din fiecare pereche de factori. Pentru o anumită pereche, orice factor primit nu influențează rezultatul segregării pentru nicio altă pereche. Prin urmare, conform principiului segregației independente, toate - combinațiile posibile de gameți se vor forma cu frecvență egală.

Figura 3.7 arată, folosind un pătrat Punnett, cum acționează principiul segregației independente în formarea generației F2 . Examinați formarea gameților de către plantele F2 . Segregarea prevede ca fiecare gamet să primească o alelă V sau v₀ și o alelă R sau *r.* Transmisia independentă stipulează că cele patru combinații (VR, Vr, *vR* și vr) se vor forma cu probabilitate egală.

fertilizările cu Ft În XF, fiecare zigot are o probabilitate egală de a primi una dintre cele patru combinații de la fiecare părinte. Dacă se produce un număr mare de urmași , rezultatul va fi 9/16 cu semințe galbene și rotunde, 3/16 semințe galbene și ridate, 3/16 semințe verzi și rotunde și 1/16 semințe verzi și ridate, rezultând ceea ce se numește raportul mendelian al dihibridismului 9:3:3:1. Acesta este un raport ideal bazat pe probabilitatea diferitelor evenimente de segregare, asortarea independentă și fertilizarea aleatorie. Raportul ideal va fi rareori obținut, din cauza abaterilor strict aleatorii, mai ales dacă lucrăm cu un număr mic de urmași.

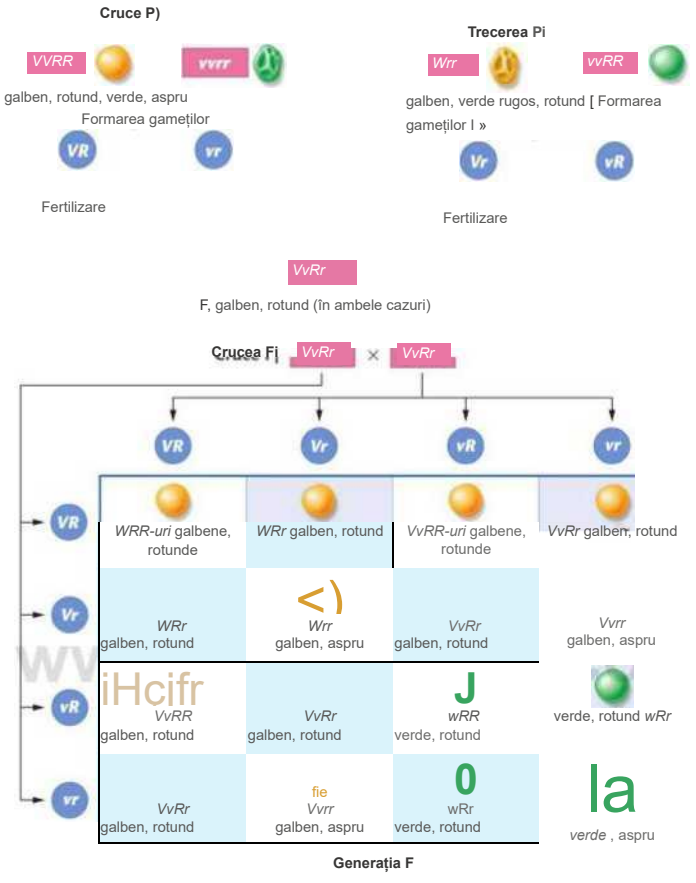
Crucea de testare: două caractere

Putem aplica încrucișarea de testare și la indivizi care exprimă două trăsături dominante, dar au un genotip necunoscut . De exemplu, fenotipul galben, rotund descris mai sus în generația F2 ar putea rezulta din genotipurile WRR, WRr, *VvRR sau VvRr.* Dacă o plantă crescută dintr-o sămânță F2 galbenă, rotundă este încrucișată cu o plantă recesivă homozigotă cu semințe verzi, ridate (vvrr), analiza urmașilor va indica corect genotipul acelei semințe galbene, rotunde . Fiecare dintre aceste genotipuri va produce o serie de gameți diferiți care , într- o încrucișare de testare , vor genera urmași cu seturi distincte de fenotipuri. Încercați să calculați rezultatele fiecăreia dintre aceste patru încrucișări pentru a vă asigura că înțelegeți conceptul.

Încrucișările trihibride demonstrează că principiile lui Mendel sunt aplicabile moștenirii mai multor trăsături

Până acum am luat în considerare moștenirea a până la două perechi de trăsături alternative. Mendel a arătat că procesul de segregare și sortare independentă poate fi aplicat la trei perechi de trăsături alternative prin intermediul a ceea ce se numește o încrucișare trihibridă și, de asemenea , o *încrucișare cu trei factori* .

Deși o încrucișare trihibridă este ceva mai complexă decât o încrucișare dihibridă, rezultatul poate fi calculat cu ușurință urmând principiile segregării și sortării independente . De exemplu , luați în considerare încrucișarea prezentată în Figura 3.8, unde perechile de gene care reprezintă trăsăturile alternative teoretice sunt simbolizate prin A, *a, B, b, C și c.* În încrucișarea dintre *AABBCC* și *aabbcc,* Toți indivizii din generația F1 sunt heterozigoți pentru toate cele trei perechi de gene . Genotipul lor, *AaBbCc,* are ca rezultat un fenotip care exprimă trăsăturile dominante *A, B și C.* Când indivizii F1 acționează ca părinți, ei produc opt tipuri diferite de gameți cu frecvență egală. Din aceasta, putem construi un pătrat Punnett cu 64 de pătrate și citi fenotipurile. Deoarece această metodă este foarte laborioasă , pentru încrucișări care implică mai mulți factori , a fost concepută o altă metodă, metoda diagramei de ramificare , pentru a calcula rapoartele așteptate .



Raport genotipic în F2 Raport fenotipic în F2

1 /16 *VVRR*
2/16 VVRr 2/
1 6 *VvRR*
4/16 *VvRr* ---------9/16 galben, rotund

1/16 *Wrr*
2/16 Vvrr - 3/16 galben, rugos

1/16 *vvRR*
2/1 6 *vvRr* 3/16 verde, rotund

1/16 *wrr* ---------- 1/16 verde, brut

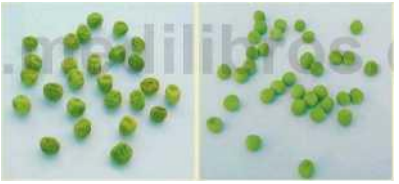
FIGURA 3.7 Analiza încrucișărilor dihibride prezentate în Figura 3.5. Plantele F heterozigote sunt autofecundate pentru a da naștere generației F2 , care se calculează folosind pătratul Punnett. Sunt prezentate raporturile fenotipice și genotipice ale F2 .

De ce mazărea lui Mendel se încrețește: o explicație moleculară

S. Abia recent - la mai bine de un secol după ce Mendel a folosit - mazăre încrețită în experimentele sale inovatoare de hibridizare - am reușit să descoperim mecanismul prin care gena *„wrinkle"* face ca mazărea să fie încrețită. Alela de tip sălbatic a genei codifică o proteină numită *enzimă de ramificare a amidonului (SBEI)*. Această enzimă catalizează formarea moleculelor de amidon puternic ramificate pe măsură ce semințele se maturizează.

Mazărea ridată, care rezultă din prezența homozigotă a formei mutante a genei, nu are activitatea - acestei enzime. În consecință , producerea de puncte de ramificare în timpul sintezei amidonului în sămânță este inhibată , ceea ce duce la acumularea de mai multă zaharoză și la un conținut mai mare de apă pe măsură ce sămânța se dezvoltă . Presiunea osmotică din sămânță crește, determinând pierderea de apă, ceea ce duce în cele din urmă la un aspect ridat la maturitate . În schimb , semințele în curs de dezvoltare care poartă cel puțin o copie a genei normale (adică sunt homozigote pentru alela dominantă sau heterozigote) sintetizează - amidon și ating echilibrul osmotic , reducând la minimum pierderea de apă . Rezultatul final este un înveliș exterior neted .

Clonarea și analiza genei *SBEI* au oferit o înțelegere mai profundă a relațiilor dintre genotipuri și fenotipuri. Interesant este că gena mutantă conține o secvență ciudată de aproximativ 800 de perechi de baze care perturbă secvența codificatoare normală . Acest segment ciudat seamănă foarte mult cu secvențele numite transpozoni , sau elemente genetice transpozabile, despre care s-a descoperit că se pot deplasa dintr - o locație în alta în genomul anumitor organisme. Transpozonii au fost găsiți la porumb , pătrunjel , gura-leului (Antirrhinum) și muște de fructe, printre multe alte organisme .



Mazăre de grădină rotundă, ridată, caracteristicile fenotipice ale uneia dintre încrucișările monohibride ale lui Mendel .

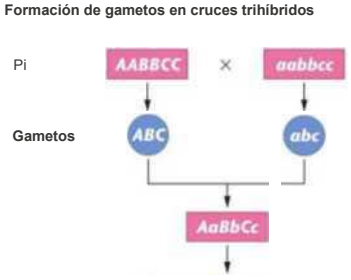


FIGURA 3.8 Formarea gameților la P și la Fj într-o încrucișare trihibridă.

Metoda diagramei de ramificare

Este mult mai ușor să se considere fiecare pereche de caractere alternative separat și apoi să se combine rezultatele folosind metoda diagramei de ramificare, care este prezentată în Figura 3.6. Această metodă, numită și diagrama de ramificare, se bazează pe simpla aplicare a legilor de probabilitate stabilite pentru încrucișările dihibride. Presupune că fiecare pereche de gene se comportă independent în formarea gameților .

se realizează încrucișarea monohibridă *AA* X aa , știm că

1. Toți indivizii F au genotipul *Aa* și exprimă fenotipul reprezentat de alela *A,* pe care îl vom numi de acum înainte fenotipul *A.*
2. Generația F va fi formată din indivizi cu fenotipul A sau fenotipul *a,* într -un raport de 3:1.

ACUM REZOLVĂ ASTA

3.2 În ceea ce privește trăsăturile mendeliene care reglează aspectul rotund sau ridat și galben sau verde, luați în considerare încrucișările indicate mai jos și determinați genotipurile plantelor parentale implicate, analizând fenotipurile urmașilor acestora.

Plante-mamă	Descendenți
(a) rotund, galben X rotund, galben	3/4 rotunde, galbene 1/4 brut, galben
(b) rugos, galben X rotund, galben	2/16 brut, verde 6/16 rotund, galben; 2/16 rotund, verde; 6/16 brut, galben
(c) rotund, galben X rotund, galben	cartuș 9/16, galben 3/16 rundă, verde 3/16 brut, galben; 1/16 brut, verde
(d) rotund, galben X rugos, verde	1/4 rotund, galben 1/4 rotund, verde; 1/4 brut, galben; 1/4 brut, verde

▪ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea celor două postulate ale lui Mendel , inclusiv postulatul segregației independente. Cheia soluției este să notați, în fiecare caz, tot ce știți cu siguranță. Acest lucru reduce problema la esențial și clarifică ceea ce trebuie determinat. De exemplu, planta galbenă, ridată din cazul (b) trebuie să fie homozigotă pentru alelele recesive de ridare și să poarte cel puțin o alelă dominantă pentru trăsătura galbenă. După ce am stabilit acest lucru, rămâne doar să determinăm alela rămasă pentru culoarea cotiledonilor.*

Aceeași generalizare poate fi aplicată încrucișărilor *BB* x *bb* și CC x *cc.* Astfel, în F2 , 3/4 din toate organismele vor exprima fenotipul A, 3/4 *B* și 3/4 C. În mod similar, 1/4 din toate organismele vor exprima fenotipul a , 1/4 *b* și 1/4 *c.* Proporția organismelor care exprimă fiecare combinație fenotipică poate fi prezisă presupunând că fertilizarea - după asortarea independentă a acestor trei perechi de gene în timpul formării gameților - are loc aleatoriu. Trebuie pur și simplu să aplicăm din nou legea probabilităților bazată pe produs . Figura 3.9 utilizează metoda diagramei de ramificare pentru a calcula raporturile fenotipice pentru generația F2 . Acestea adoptă raportul trihibrid 27 :9:9:9:3:3:3:1 . Aceeași metodă poate fi aplicată pentru a rezolva încrucișările care implică orice număr de perechi de gene , cu condiția ca *toate perechile* de *gene să fie moștenite independent* . Vom vedea mai târziu că perechile de gene nu sunt întotdeauna transmise complet independent . Cu toate acestea, segregarea independentă s-a dovedit a fi adevărată pentru toate trăsăturile studiate de Mendel.

Rețineți că Figura 3.9 prezintă doar raporturile fenotipice pentru F2, dar putem calcula și raporturile genotipice . Pentru a face acest lucru, să luăm în considerare din nou perechile de gene *A/a, B/b* și *C/c.* Este separată. De exemplu, pentru perechea *A/a,* încrucișarea lui F! este *Aa.* X Aa . În F2 se obține un raport fenotipic de 3/4 A: 1/4 *a* . Totuși , raportul genotipic în F2 este diferit : 1/4 AA: 1/2 *Aa:* 1/4 *aa.* Folosind Figura 3.9 ca model , am introduce aceste frecvențe genotipice în coloana din stânga a diagramei. Fiecare ar fi conectată prin trei linii la 1/4 *BB,* 1/2 *Bb* și respectiv 1/4 *bb* . Din fiecare dintre cele nouă alternative rezultate , am extinde încă trei linii la genotipurile 1/4 CC, 1/2 Cc și 1/4 *cc.* În partea dreaptă a diagramei complete, ar apărea 27 de genotipuri, împreună cu frecvențele lor.

În încrucișările dintre două sau mai multe perechi de gene , calcularea numărului de gameți și a rezultatelor fenotipice și genotipice este destul de complexă. Câteva reguli matematice simple vă vor permite să verificați acuratețea diferiților pași necesari pentru a rezolva problemele genetice . Mai întâi , trebuie să determinați numărul de perechi de gene din

Obtención de las proporciones fenotípicas de un trihibridismo en F_2

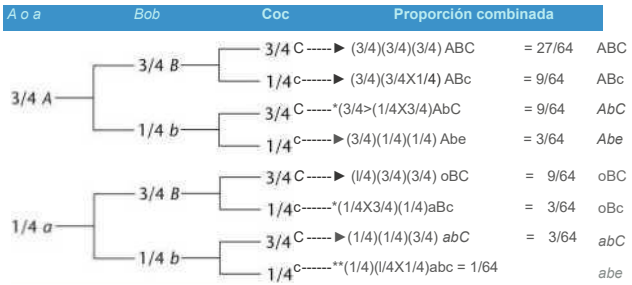


FIGURA 3.9 Obtención de las proporciones fenotípicas de un trihibridismo en F_2, utilizando el método del diagrama ramificado, que se basa en las probabilidades esperadas de cada fenotipo.

heterozigoția (n) implicată în încrucișare. De exemplu, dacă este vorba de încrucișarea *AaBb* X *AaBb,* n = 2; pentru *AaBbCc* X *AaBbCc, n* = 3. Pentru *AaBBCcDd* X *AaBBCcDd, n = 3* (deoarece gena *B* nu este heterozigotă). Odată ce *n este determinat, 2^ n* va fi numărul de gameți diferiți pe care fiecare părinte îi poate forma; 3^n va fi numărul de genotipuri diferite obținute după fertilizare; și 2^n va fi numărul de fenotipuri diferite obținute din aceste genotipuri. Aceste reguli, care pot fi aplicate încrucișărilor care implică orice număr de gene, atâta timp cât acestea sunt moștenite independent, sunt rezumate în *Tabelul* 3.1.

TABLA 3.1 Reguli matematice simple, utile pentru rezolvarea problemelor genetice

Încrucișări între organisme heterozigote pentru gene transmise independent

Numărul de perechi de gene heterozigote	Numărul de diferite tipuri de gameți formați	Numărul de genotipuri diferite produse	Numărul de fenotipuri diferite produse*
RT	2"	3"	2**
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
4	16	81	16

perechile de gene există o relație simplă de dominanță-recesiune.

ACUM REZOLVĂ ASTA

3.3 Folosind metoda diagramei de ramificare, determinați raporturile genotipice și fenotipice ale următoarelor încrucișări trihibride: (a) *AaBbCc* X *AaBBCC,* (b) *AaBBCc* X *aaBBCc* și (c) *AaBbCc* X *AaBbCc.*

■ **SUGESTIE:** *Această problemă vă cere să utilizați metoda diagramei ramificate pentru a determina rapid rezultatele genetice . Cheia rezolvării este să luați în considerare fiecare pereche de gene independent. Mai întâi, preziceți rezultatul pentru genele A/a și înregistrați-l. Apoi, pentru fiecare dintre aceste rezultate, înregistrați predicțiile pentru genele B/b. În cele din urmă, pentru fiecare dintre aceste rezultate noi, înregistrați predicțiile pentru genele C/c. Veți fi apoi gata să obțineți raporturile corespunzătoare ale tuturor combinațiilor posibile.*

Opera lui Mendel a fost redescoperită la începutul secolului al XX-lea

Munca lui Mendel, începută în 1856, a fost prezentată Societății de Istorie Naturală din Brünn în 1865 și publicată în anul următor. Cu toate acestea, deși descoperirile sale au fost adesea citate și discutate , adevărata lor semnificație a trecut neobservată timp de aproximativ 35 de ani. Au fost sugerate numeroase motive pentru a explica această întârziere.

În primul rând, utilizarea de către Mendel a analizei matematice a probabilității evenimentelor a fost o abordare complet neobișnuită în studiile biologice din acea vreme și s-ar fi putut părea ciudată contemporanilor săi. Dar, mai important, concluziile trase din această analiză nu se potriveau bine cu ipotezele existente despre originea variației în organisme. Subiectul variației naturale i - a intrigat pe cercetătorii teoriei evoluționiste , care , stimulați de propunerile lui Charles Darwin și Alfred Russel Wallace, credeau în variația continuă, conform căreia urmașii erau un amestec al fenotipurilor părinților . În schimb , Mendel a emis ipoteza că variația se datora unei relații de dominanță - recesivitate între unități discrete , rezultând o variație discontinuă . De exemplu, rețineți că florile F2 din Figura 3.1 sunt întotdeauna albe sau violete , niciodată o culoare intermediară . Mendel a propus că urmașii F2 ai unei încrucișări dihibride exprimau pur și simplu trăsăturile produse de noi combinații de factori existenți anterior . Prin urmare , ipotezele lui Mendel nu se potriveau bine cu preconcepțiile biologilor evoluționiști despre cauzele variației .

În plus, este probabil ca contemporanii lui Mendel să nu fi înțeles că postulatele sale explică *modul în care* variația este transmisă urmașilor . În schimb , este posibil să fi încercat să interpreteze lucrările sale într-un mod care a ridicat întrebarea de *ce* Anumite fenotipuri supraviețuiesc preferențial . Aceasta era întrebarea pusă de teoria selecției naturale , dar Mendel însuși nu o luase în considerare . Opinia colectivă a colegilor științifici ai lui Mendel ar fi putut fi umbrită de impactul extraordinarei teorii a evoluției organice a lui Darwin .

Teoria cromozomială a moștenirii

Spre sfârșitul secolului al XIX-lea , o observație remarcabilă a pregătit terenul pentru recunoașterea operei lui Mendel : descoperirea de către Walter Flemming a cromozomilor în nucleele celulelor de salamandră . În 1879, Flemming a descris comportamentul acestor structuri filamentoase în timpul diviziunii celulare . Ca o consecință a descoperirii lui Flemming și a multor alți citologi, prezența unităților discrete în nucleu a devenit curând o parte integrantă a înțelegerii eredității de către oamenii de știință .

La începutul secolului al XX-lea, trei botaniști, Hugo DeVries, Karl Correns și Erich Tschermak,

au efectuat independent experimente de hibridizare similare cu cele ale lui Mendel. Lucrările lui DeVries au demonstrat principiul segregării la mai multe specii de plante. Apoi, el a căutat în literatura științifică disponibilă și a descoperit că lucrările lui Mendel anticipaseră propriile sale concluzii. Correns și Tschermak au ajuns, de asemenea, la concluzii similare cu cele ale lui Mendel .

Cam în aceeași perioadă, citologii Walter Sutton și Theodor Boveri au publicat independent lucrări care leagă descoperirile lor despre comportamentul cromozomilor în timpul meiozei de principiile mendeliene ale segregării și segregației independente . Aceștia au sugerat că separarea cromozomilor în timpul meiozei ar putea fi baza citologică pentru aceste două principii. Deși credeau că factorii lui Mendel erau probabil cromozomi, mai degrabă decât gene în interiorul cromozomilor, descoperirile lor au restabilit importanța lucrării lui Mendel, oferind o bază pentru cercetările ulterioare în genetică. Sutton și Boveri sunt recunoscuți ca inițiatorii teoriei cromozomiale a moștenirii, ideea că materialul genetic al organismelor vii este conținut în cromozomi, o idee care avea să fie dezvoltată în următoarele două decenii. După cum vom vedea în capitolele următoare, lucrările lui Thomas H. Morgan, Alfred H. Sturtevant, Calvin Ridges și ale altora au stabilit dincolo de orice îndoială rezonabilă că ipoteza lui Sutton și Roveri era corectă.

Factori, gene și cromozomi omologi

Deoarece corelația dintre observațiile lui Sutton și Roveri și principiile mendeliene stă la baza interpretării moderne a geneticii transmiterii , vom examina această corelație în detaliu înainte de a trece la alte subiecte.

După cum știm, fiecare specie are un număr specific de cromozomi în fiecare nucleu al celulelor sale somatice. La organismele diploide, acest număr se numește număr diploid (2n) și este caracteristic speciei respective . În timpul formării gameților (meioză), acest număr se reduce exact la jumătate (n), iar când doi gameți se unesc în fertilizare, numărul diploid se restabilește . Cu toate acestea, în meioză, numărul de cromozomi nu se reduce aleatoriu. Primilor citologi le era clar că numărul diploid de cromozomi este compus din perechi omoloage identificabile prin aspectul și comportamentul lor morfologic. Gameții au câte un membru din fiecare pereche - prin urmare, complementul cromozomial al unui gamet este foarte specific, iar numărul de cromozomi din fiecare gamet este egal cu numărul haploid.

Cu aceste informații de bază, putem observa corelația dintre comportamentul factorilor , cromozomilor și genelor. Figura 3.10 prezintă trei dintre principiile lui Mendel și explicația cromozomială pentru fiecare. Factorii sunt, de fapt, gene situate pe perechi de cromozomi omologi [Figura 3.10(a)]. Membrii fiecărei perechi omoloage se separă sau segregă în timpul formării gameților [Figura 3.10 (b)]. În figură sunt posibile două alinieri diferite , ambele fiind prezentate .

Pentru a ilustra principiul segregației independente , este important să se facă distincția între membrii oricărei perechi de cromozomi omologi. Un membru al fiecărei perechi provine de la tată, în timp ce celălalt provine de la mamă . Reprezentăm diferitele origini paterne cu culori diferite. După cum se arată în Figura 3.10(c), după segregarea independentă a fiecărei perechi de omologi, fiecare gamet primește câte un membru din fiecare pereche de cromozomi. Toate combinațiile posibile se formează cu probabilitate egală . Dacă adăugăm la diagramă simbolurile utilizate în încrucișarea dihibridă a lui Mendel (V, v și R, r), vedem de ce se formează un număr egal din cele patru tipuri de gameți . Comportamentul independent al perechilor de factori mendelieni (V și *R* în acest exemplu) se datorează faptului că aceștia sunt situați pe perechi diferite de cromozomi omologi .

Observând diversitatea fenotipică a organismelor vii, este logic să presupunem că există mult mai multe gene decât cromozomi. Prin urmare, fiecare cromozom omolog trebuie să poarte informații genetice pentru mai mult de o trăsătură. Ideea acceptată în prezent este că fiecare cromozom este compus dintr-un număr mare de gene aranjate liniar , care sunt cele care transportă informația . Perechile de factori Mendel (care determină trăsătura de tulpină înaltă sau pitică , de exemplu) constituie de fapt o pereche de gene situate pe o pereche de cromozomi omologi. Locația de pe cromozom unde se află o anumită genă se numește locus (pl. loci). Diferitele alele ale unei anumite gene (de exemplu , V sau v) prezintă mici diferențe în informațiile genetice (galben sau verde) care determină aceeași trăsătură (culoarea semințelor). Deși am studiat doar gene cu două alele, majoritatea genelor au mai mult de două forme alelice alternative . Încheiem această secțiune prin trecerea în revistă a criteriilor necesare pentru a clasifica doi cromozomi drept o pereche omoloagă .

1. În mitoză și meioză , când cromozomii sunt vizibili cu forma lor caracteristică, ambii membri ai unei perechi omoloage au aceeași dimensiune și locație identică a ...

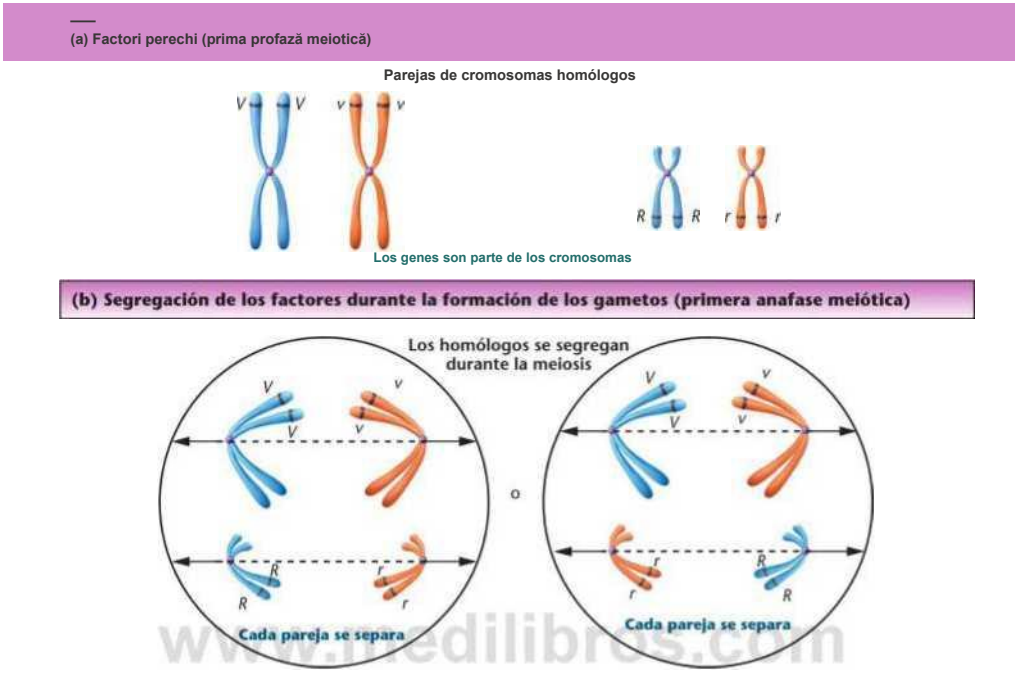

(a) Factori perechi (prima profază meiotică)
Parejas de cromosomas homólogos
V V
v v
R R
r r
Los genes son parte de los cromosomas
(b) Segregación de los factores durante la formación de los gametos (primera anafase meiótica)
Los homólogos se segregan durante la meiosis
o
Cada pareja se separa
Cada pareja se separa
(c) Transmiterea independentă a factorilor care sunt segregați (după numeroase evenimente melotice)
Los cromosomas no homólogos se transmiten independientemente
1/4
1/4
1/4
1/4
Todas las posibles combinaciones gaméticas se forman con igual probabilidad

FIGURA 3.10 Corelația dintre postulatele mendeliene ale (a) perechilor de factori, (b) segregării și (c) segregației independente, arătând prezența genelor situate pe cromozomii omologi și comportamentul acestora în timpul meiozei.

centromer. Excepția o fac cromozomii care determină sexul (de exemplu, cromozomii X și Y la mamifere).

2. La începutul meiozei, cromozomii omologi se împerechează sau stabilesc sinapse.
3. Deși în general nu este vizibil la microscop , loci-urile genice au același aranjament liniar în cadrul omologilor.

3.6

Moștenirea independentă duce la o mare variație genetică

O consecință a segregației independente este producerea de

gameți genetic diferiți de către un individ. Variația genetică există deoarece cei doi membri ai oricărei perechi de cromozomi omologi sunt rareori, dacă nu vreodată, identici genetic. Deoarece membrii paterni și materni ai tuturor perechilor se distribuie printre gameți independent unul de celălalt, pot fi generate toate combinațiile cromozomiale posibile, rezultând o mare diversitate genetică.

Am văzut că pentru orice individ, numărul de gameți posibili cu o compoziție cromozomială diferită este 2^n, unde n este egal cu numărul haploid. Astfel, dacă o specie are un număr haploid egal cu 4, atunci se pot forma 2^{4} (adică 16) combinații de gameți ca urmare a asortării independente. Deși acest număr nu este foarte mare, să luăm în considerare specia umană, unde $n = 23$. Dacă calculăm 2^{23}, constatăm că sunt posibili puțin peste 8 milioane de gameți diferiți. Deoarece fertilizarea implică doar unul dintre cele aproximativ 8 milioane de gameți posibili de la fiecare dintre cei doi părinți, fiecare urmaș reprezintă doar unul dintre $(8 \times 10^{6})^{2} = 64 \times 10^{12}$ combinații genetice posibile. Întrucât această probabilitate este mai mică de unu la un trilion, nu este surprinzător faptul că fiecare membru al speciei umane prezintă un set distinct de caracteristici, cu excepția cazului gemenilor identici : acest număr de combinații cromozomiale este mult mai mare decât numărul de indivizi umani care trăiesc sau au trăit pe planeta noastră! Variația genetică care rezultă din segregarea independentă a fost foarte importantă în procesul evolutiv al tuturor organismelor care se reproduc sexual.

3.7

Legile probabilității ne ajută să explicăm fenomenele genetice

Așa cum am menționat anterior, raporturile genetice sunt exprimate mai precis ca probabilități - de exemplu, 3/4 înălțime: 1/4 pitic. Aceste valori prezic rezultatul fiecărei fertilizări, astfel încât probabilitatea ca fiecare zigot să aibă potențialul genetic de a fi înalt este de 3/4 , în timp ce potențialul de a fi pitic este de 1/4. Intervalul de probabilitate variază de la 0, când un eveniment *este sigur că nu se va produce* , până la 1, când *este sigur că se va produce* . În această secțiune vom analiza relația dintre

La enfermedad de Tay-Sachs: bases moleculares de los trastornos recesivos en los seres humanos

Una cuestión interesante con respecto a los caracteres mendelianos es la relativa a la forma en que los genes mutantes producen fenotipos mutantes. Podemos comprender mejor la cuestión considerando las explicaciones actuales acerca del gen que provoca la enfermedad de Tay-Sachs (TSD), un trastorno hereditario recesivo de carácter devastador que implica la irreversible destrucción del sistema nervioso central. Los niños que padecen TSD no presentan ningún tipo de síntoma en el nacimiento y parecen desarrollarse normalmente hasta, aproximadamente, los seis meses de edad. A partir de ahí, comienza un proceso de pérdida de capacidades físicas y mentales. Los niños afectados terminan por sufrir ceguera, sordera, retraso mental y parálisis, a menudo durante el primer o segundo año de vida. Raramente viven más allá de los cinco años. Se trata de un caso típico de enfermedad autosómica recesiva, en el que dos padres heterocigóticos que no sufren la enfermedad, y que a menudo no cuentan con historial inmediato de dicha enfermedad en su familia, tienen una probabilidad de 1/4 de tener un niño con Tay-Sachs.

Sabemos que las proteínas son el producto final de la expresión de la gran mayoría de los genes. Se ha identificado cuál es el producto proteínico implicado en la TSD y ahora comprendemos claramente las bases moleculares subyacentes de esta enfermedad. La TSD aparece como resultado de la pérdida de actividad de una única enzima: la hexosaminidasa A (Hex-A). La Hex-A, que normalmente se encuentra en los lisosomas dentro de las células, es necesaria para descomponer el ganglióside GM2, un componente lipídico de las membranas de las células nerviosas. Sin Hex-A funcional, los gan- gliósidos se acumulan en las neuronas cerebrales y provocan el deterioro del sistema nervioso. Los portadores heterocigóticos de la TSD, que tienen una copia normal del gen, producen solo en torno al 50 por ciento de la cantidad normal de Hex-A, pero no manifiestan síntomas de la enfermedad. El hecho de que la actividad de un único gen (un alelo de tipo natural) es suficiente para el desarrollo y funcionamiento normales del sistema nervioso, explica e ilustra las bases moleculares de las mutaciones recesivas. El fenotipo mutante solo se hace evidente cuando ambos genes están afectados por la mutación. El gen responsable se encuentra en el cromosoma 15 y codifica la subunidad alfa de la enzima Hex-A. A fecha de hoy, ya se han identificado más de 50 mutaciones distintas del gen que provocan la aparición de fenotipos TSD.

Probabilitate și genetică. Când două sau mai multe evenimente au loc independent unul de celălalt, dar în același timp, putem calcula probabilitatea ca ambele evenimente să aibă loc împreună. Acest lucru se realizează prin aplicarea legii produsului, care afirmă că probabilitatea ca două sau mai multe rezultate să aibă loc simultan este egală cu produsul *probabilităților* lor individuale (vezi Secțiunea 3.3). Două sau mai multe evenimente sunt independente dacă rezultatul unuia nu afectează rezultatul niciunuia dintre celelalte luate în considerare .

Pentru a ilustra utilizarea legii produsului, să luăm în considerare rezultatele posibile ale aruncării simultane a unei monede de un euro (£) și a unei monede de un dolar (D) și să examinăm toate combinațiile posibile de cap (HH) și pajură (TT) care pot rezulta. Există patru rezultate posibile:

$$^{CA\text{-}DCA)} = (l/2)(l/2) = 1/4$$
$$(E_{CS} : D_{CA}) = (1/2M1/2) = 1/4$$
$$(£_{C} / D_{CS}) = (1/2X1/2) = 1/4$$
$$(£_{CR} : D_{CR}) = (l/2)(l/2) = 1/4$$

Probabilitatea de a obține cap sau pajură cu orice monedă este 1/2, indiferent de rezultatul cu cealaltă monedă. Predicția este că toate cele patru combinații posibile apar cu probabilitate egală.

Dacă suntem interesați să calculăm probabilitatea ca rezultatele posibile a două evenimente să fie independente unul de celălalt, dar să se poată produce în mai multe moduri, vom aplica legea adunării. De exemplu, care este probabilitatea de a obține cap și pajură la aruncarea unui euro și a unui dolar? Într-un astfel de caz, nu contează dacă euro sau dolarul cade pe cap, atâta timp cât cealaltă monedă cade pe rezultatul alternativ. După cum am văzut anterior, există două moduri în care rezultatul așteptat se poate produce : (H≈D≈) și ($_{H\approx D\approx D\approx}$). $^{ca \wedge a\ one}$ dintre ele cu o probabilitate de 1/4 . Legea adunării prevede că probabilitatea obținerii unui rezultat , atunci când acel rezultat poate fi obținut prin două sau mai multe evenimente, este egală cu suma probabilităților fiecăruia dintre aceste evenimente. Prin urmare, conform legii adunării, probabilitatea generală în cazul nostru este egală cu

$$(l/4) + (l/4) = (1/2)$$

Putem prezice că jumătate din toate aruncările vor avea rezultatul așteptat.

Aceste legi simple ale probabilității vor fi utile în studiul nostru privind genetica moștenirii și atunci când vom rezolva probleme de genetică. De fapt, am aplicat deja legea produsului atunci când am folosit metoda diagramei de ramificare pentru a calcula rezultatele fenotipice ale încrucișărilor mendeliene dihibride și trihibride. Când vrem să cunoaștem rezultatul unei încrucișări, trebuie doar să calculăm probabilitatea fiecărui rezultat posibil. Rezultatele acestui calcul ne vor permite să prezicem proporția de urmași care vor avea fiecare fenotip sau fiecare genotip.

Este important să ne amintim un punct crucial atunci când ne ocupăm de probabilitate : predicțiile privind rezultatele posibile sunt, în general, exacte doar pentru eșantioane mari . Dacă prezicem că 9/16 dintre urmașii unei încrucișări dihibride vor prezenta ambele trăsături dominante, este puțin probabil ca, într- un eșantion mic, exact 9 din 16 să le prezinte . Mai degrabă , predicția noastră este că, pentru un număr mare de urmași, aproximativ 9/16 vor exprima acest fenotip. Abaterile de la proporțiile așteptate în eșantioanele mici sunt atribuite variațiilor aleatorii , un subiect pe care îl vom discuta când vom studia statistica în secțiunea următoare . După cum vom vedea , impactul variațiilor strict aleatorii scade pe măsură ce dimensiunea eșantionului crește .

Teorema binomială

Atunci când există modalități alternative de a obține o combinație de evenimente, putem analiza aceste cazuri folosind calcule de probabilitate bazate pe teorema binomială . Astfel, putem calcula probabilitatea oricărei combinații de fii și fiice în familii de orice dimensiune . De exemplu, într -o familie cu patru copii, care este probabilitatea ca doi copii să fie de un sex, iar ceilalți doi de celălalt? Întrebarea este complicată deoarece fiecare naștere este un eveniment independent, iar același rezultat final poate fi obținut cu secvențe diferite de nașteri .

Expresia teoremei binomiale este:

$$(a + b) = 1$$

unde *a și* b *sunt* probabilitățile respective ale celor două rezultate alternative și *u* este egal cu numărul de încercări.

n	**Binom Binom extins**	
1	*(a + b)'*	*a + b*
2	*(« +b)* ^{2}	*la* ^{1} *+lab + b* ^{1}
3	*(a + b)* ^{3}	*a* ^{3} -|- *3a* ^{2}*b* + 3ab ^{2}4- b ^{2}
4	(<I 4-b)'*	*a** + 4<Pb + *6a* ^{2} *b* ^{2} + *4ab* ^{3} + b*
5	(« +b) ^{s}	*a* ^{3} + *4a*b+tOa* ^{3} *b* ^{2} + \Oa ^{2} *b* ^{3} + *5ab* ^{2} + *b* ^{3}
	etc.	etc.

Pe măsură ce numărul de termeni crește și binomul extins devine mai complex, este util să se utilizeze triunghiul lui Pascal , prezentat în Tabelul 3.2, pentru a determina coeficienții fiecărui termen din ecuația binomială. De la al treilea rând al acestui triunghi încolo, fiecare număr este suma celor două numere imediat deasupra lui .

Tabelul 3.2 ■ Triunghiul lui Pascal

n.	Coeficienți numerici
	1
1	1 1
2	1 2 1
3	13 3 1
4	1 4 6 4 1
5	1 5 10 10 5 1
6	1 6 15 20 15 6 1
7	1 7 21 35 35 21 7 1
etc.	etc.

• Rețineți că toate numerele, altele decât 1, se obțin prin adunarea celor două numere imediat deasupra lor.

Pentru a dezvolta orice binom, diferiții exponenți ai lui *a* și b *sunt determinați* (pe *ab²)* folosind modelul

$$(a + b)'' = a'', a''\sim'b, a''\sim {}^{2}b^{2}, a'''^{3}b\,3^{b} \ldots\ldots''$$

Folosind metoda anterioară pentru a calcula expresia, dezvoltarea lui (a + *b)* ^{7} *este*

$$un^{7} + 7a^{6}b + 2laV + 35u^{4}b^{3} + - + b^{7}$$

Să revenim acum la întrebarea noastră inițială: *care este probabilitatea ca într-o familie cu patru copii, doi să fie băieți și doi să fie fete?*

Mai întâi, vom atribui probabilități inițiale fiecărui rezultat:

a — bărbat = 1/2
b = femeie = 1/2

În continuare, scriem binomul extins pentru n = 4:

$$(a + b)^{4} = a^{*} + 4a^{3}b + 6a^{2}b^{2} + 4ab^{3} + b^{4}$$

Fiecare termen reprezintă un rezultat posibil, exponentul lui „ *a" fiind* numărul de bărbați, iar exponentul lui *„ b"* fiind numărul de femei. Prin urmare, expresia corespunzătoare rezultatului de a avea doi bărbați și două femei - formula de probabilitate *(p)* pe care o căutăm - este

$$p = 6a^{2}b^{2}$$
$$= 6(l/2)^{2}(1/2)^{2}$$
$$= 6(1/2)^{4}$$
$$= 6(1/16) = 6/16$$
$$p = 3/8$$

Astfel, probabilitatea ca familiile cu patru copii să aibă doi băieți și două fete este de 3/8. Dintre toate familiile cu patru copii, se prevede că 3 din 8 vor avea doi băieți și două fete.

Înainte de a examina un alt exemplu, merită menționat că, dacă preferăm să nu folosim triunghiul lui Pascal, se poate aplica o formulă pentru a determina coeficientul oricărei combinații de exponenți:

$$n! / (s!t!)$$

unde

n. = numărul total de evenimente
de dăți ale rezultatului
t - numărul de apariții ale rezultatului b

Prin urmare , n = s + t.

Simbolul ! reprezintă factorialul, care este produsul tuturor - numerelor întregi pozitive de la 1 până la un anumit număr întreg pozitiv . De exemplu ,

$$5! = (5)(4)(3)(2)(1) = 120$$

Rețineți că, folosind factoriali, 0! = 1.

Folosind formula, să determinăm probabilitatea ca într-o familie cu șapte copii să existe cinci băieți și două fete. În acest caz, n = 7, s = 5 și f = 2. Mai întâi, scriem ecuația pentru a găsi termenul corespunzător a 5 evenimente cu rezultatul *a* și a două cu rezultatul b:

$$P — {}^{a}b$$
$${}^{f}s!t!$$
$$= El^{71}{}_{(1/2)(1/2)}$$
$$\_ \frac{(7) ■ (6) ■ (5) ■ (4) ■ (3) • (2) ■ (1)}{(5) • (4) • (3) • (2) • (1) ■ (2) ■ (1)}$$
$$= 21(l/2)^{7}$$
$$= 21(1/128)$$
$$p = 21/128$$

În familiile cu șapte copii, predicția este că , în medie, 21/128 vor avea cinci băieți și două fete.

$$\frac{(7) •(6)}{(2)-(1)} \quad (1/2)^{7}$$

Calculele folosind teorema binomială au mai multe aplicații în genetică, inclusiv analiza trăsăturilor poligenice (Capitolul 23) și studiul echilibrului în populații (Capitolul 25).

Analiza chi-pătrat evaluează influența șansei asupra datelor genetice

Raporturile Niendelliene monohibride 3:1 și dihibride 9:3:3:1 sunt predicții teoretice bazate pe următoarele ipoteze: (1) fiecare alelă este fie dominantă , fie recesivă, (2) segregarea are loc în mod normal, (3) are loc

transmitere independentă și (4) fertilizarea este aleatorie . Ultimele două presupuneri sunt influențate de întâmplare și, prin urmare, sunt supuse fluctuațiilor aleatorii . Acest concept, cel de deviere aleatorie, este cel mai ușor de înțeles prin aruncarea unei monede de mai multe ori și numărarea numărului de cap și pajură care apar. La fiecare aruncare, există o probabilitate de 1/2 de cap și o probabilitate de 1/2 de pajură . În consecință , raportul așteptat după mai multe aruncări este de 1/2:1/2, sau 1:1. Dacă o monedă este aruncată de 1.000 de ori, *aproximativ* de 500 de capete și 500 de cozi. Orice fluctuație rezonabilă în raport cu acest raport ipotetic (de exemplu, 486 de capete și 514 cozi) este atribuibilă întâmplării.

numărul total de aruncări scade , impactul abaterii aleatorii crește. De exemplu, dacă aruncăm o monedă doar de 4 ori, nu ar fi prea surprinzător dacă toate cele patru aruncări ar duce fie la cap, fie la pajură. Dar pentru 1.000 de aruncări, obținerea a 1.000 de cap sau a 1.000 de pajură ar fi destul de neașteptată. De fapt, s-ar putea crede că un astfel de rezultat este imposibil, deși, pentru a fi mai precisi, probabilitatea de a obține fie toate capul , fie toate pajurile la 1.000 de aruncări este foarte mică, de (1/2) ≤ l în fiecare caz . Deoarece (1/2)*' reprezintă o probabilitate mai mică de 1 la un milion, un eveniment care să aibă loc cu o probabilitate atât de mică precum (1/2) ≤ 1.000 ar fi practic imposibil. Atunci când se prezic sau se analizează rezultatele genetice , trebuie luate în considerare două aspecte importante:

1. Rezultatele transmiterii independente și ale fertilizării, precum aruncarea unei monede în aer, sunt supuse unor fluctuații aleatorii față de evenimentele așteptate, ca o consecință a abaterilor aleatorii.
2. Pe măsură ce mărimea eșantionului crește, abaterea medie de la rezultatul așteptat scade. Prin urmare, un eșantion mai mare reduce impactul abaterilor aleatorii asupra rezultatului final.

Calculele chi-pătrat și ipoteza nulă

O abilitate importantă în genetică este capacitatea de a evalua abaterea observată. Atunci când presupunem că datele se vor conforma unui raport dat, cum ar fi 1:1, 3:1 sau 9:3:3:1, stabilim ceea ce se numește ipoteză nulă (H_0) . Se numește astfel deoarece ipoteza presupune că nu există *o diferență reală* între *valorile observate* (sau raportul observat) și valorile *așteptate* (sau raportul așteptat). Diferența *aparentă* poate fi atribuită în întregime întâmplării . Validitatea ipotezei nule pentru un set dat de date este măsurată prin analiză statistică . În funcție de rezultatele acestei analize, ipoteza nulă poate fie (1) *să fie respinsă,* sau (2) *să nu fie respinsă.* Dacă este respinsă, vom considera că abaterea observată de la rezultatul așteptat *nu este* atribuibilă exclusiv întâmplării; în acest caz, ipoteza nulă și ipotezele care o susțin vor trebui reexaminate . Dacă ipoteza nulă nu este respinsă, vom continua să atribuim orice abatere observată întâmplării.

Unul dintre cele mai simple teste statistice pentru a verifica calitatea ipotezei nule este analiza chi-pătrat (X). Acest test ia în considerare abaterile observate ale fiecărei componente a unei proporții (în raport cu valorile așteptate), precum și dimensiunea eșantionului și le reduce la o singură valoare numerică. Valoarea lui x^2 Apoi este utilizat pentru a estima frecvența cu care se poate aștepta ca abaterea observată să apară, strict din întâmplare . Formula utilizată în analiza chi-pătrat este:

$$_2 \_ \frac{(o - e)^2}{x^2 \ au \ fost}$$

unde *sau* este valoarea observată pentru o anumită categorie, *e* este valoarea așteptată pentru categoria respectivă, iar 2 (litera grecească sigma) reprezintă suma valorilor calculate pentru fiecare categorie a acelei proporții. Având în vedere că (o - e) este abaterea *(d)* În fiecare caz, ecuația poate fi simplificată la

$$\hat{} - 7$$

Tabelul 3.3(a) prezintă, pas cu pas , procedura de calculare a lui x^2 pentru rezultatele F2 ale unei încrucișări monohibride ipotetice . - Pentru a analiza aceste date, trebuie să parcurgeți tabelul de la stânga la dreapta , calculând și introducând numerele corespunzătoare în fiecare coloană. Indiferent dacă abaterea standard d este *pozitivă* sau negativă, *d2 va* fi întotdeauna pozitivă. Tabelul 3.3 (b) ilustrează analiza rezultatelor F2 · a unei încrucișări dihibride ipotetice . Asigurați - vă că înțelegeți cum a fost calculată fiecare valoare din acest exemplu .

Pasul final în analiza chi-pătrat este interpretarea valorii x · Pentru a face acest lucru , trebuie mai întâi să determinăm gradele de libertate (dl), care în această analiză sunt egale cu ∫n - 1, unde n este numărul de categorii diferite în care poate fi clasificat fiecare punct de date , adică numărul de rezultate posibile. Pentru proporția 3 : 1 , n = 2, prin urmare *gl* — 1. Pentru raportul 9:3:3:1, n = 4 și *dl* = 3. Gradele de libertate trebuie luate în considerare deoarece , cu un număr mai mare de categorii, va exista o abatere mai mare ca urmare a întâmplării.

Odată ce numărul de grade de libertate a fost determinat , putem interpreta valoarea lui x^2 în termeni ai unei valori de probabilitate corespunzătoare (p) . Deoarece acest calcul este complex, valoarea lui *p* este

M Análisis de ji-cuadrado

(a) Cruce monohíbrido Proporción esperada	Observado (o)	Esperado (e)	Desviación (o - e)	Desviación (d^2)	<*'/*
3/4	740	3/4(1.000) = 750	740 - 750 = -10	$(-10)^2$ = 100 (+ 10)^2 =	100/750 = 0,13
1/4	260	1/4(1.000) = 250	260 - 250 = +10	100	100/250 = 0,40
	Total = 1.000				X^2 = 0,53 *p* = 0,48

(b) Cruce dihíbrido Proporción esperada	*o*	e	(o-e)	d^2	d^2/e
9/16	587	567	+20	400	0,71
3/16	197	189	+ 8	64	0,34
3/16	168	189	-21	441	2,33
1/16	56	63	-7	49	0,78
	Total = 1.008				X^2 = 4,16 *ți = 0,26*

de obicei

Căutați *într* -un tabel sau grafic. Figura 3.11 prezintă o gamă largă de valori g^2 . și valorile p corespunzătoare acestora pentru diferite grade de libertate, atât sub formă grafică , cât și tabelară. Vom folosi graficul pentru a explica modul în care se determină valoarea p . Legenda pentru Figura 3.11(b) explică modul de utilizare a tabelului.

Pentru a determina *p* folosind graficul, trebuie urmați următorii pași :

1. Localizați valoarea g^2 pe axa absciselor (axa *X* sau orizontală).
2. Trasați o linie verticală de la acel punct până la linia de pe grafic care reprezintă df -*ul* corespunzător .
3. Extindeți o linie orizontală din acel punct spre stânga, până când intersectează axa y (axa verticală y).
4. Estimați, prin interpolare, valoarea corespunzătoare a lui *p.*

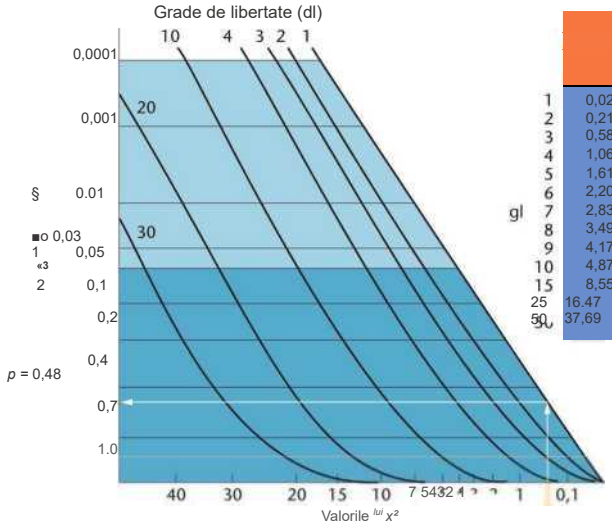
Am folosit acești pași pentru încrucișarea monohibridă din Tabelul 3.3(a), estimând o valoare p de 0,48, așa cum se arată în Figura 3.11(a). Acum folosiți această metodă pentru a vedea dacă puteți determina valoarea p pentru încrucișarea dihibridă [Tabelul 3.3(b)]. Deoarece valoarea x^2 este 4,16 și *dl* = 3, valoarea p aproximativă va fi 0,26. Verificând acest rezultat în raport cu tabelul, putem confirma că cele două valori p, pentru încrucișările monohibridă *și* dihibridă, se află între 0,20 și 0,50.

Interpretarea valorilor probabilității

Până acum , ne-am preocupat doar de calcularea valorilor x^2 și de determinarea valorilor p corespunzătoare . Acești pași ne conduc la cel mai important aspect al analizei chi-pătrat : înțelegerea a ceea ce înseamnă de fapt valoarea p. Cel mai simplu mod de a ne gândi la valoarea p este ca procent. Să folosim exemplul încrucișării dihibride din Tabelul 3.3 (b) , unde p = 0,26 , ceea ce poate fi considerat 26 %. În cazul nostru, valoarea p indică faptul că, dacă am repeta experimentul de mai multe ori, în 26% din repetiții am găsi o abatere datorată întâmplării la fel de mare sau mai mare decât cea observată în testul inițial . În schimb , 74 % din repetiții ar arăta o abatere datorată întâmplării mai mică decât cea observată inițial. Discuția precedentă despre valorile p indică faptul că o ipoteză nulă (referitoare, în acest caz, la raportul 9:3:3:1) nu se demonstrează niciodată a fi absolut adevărată sau falsă . Mai degrabă , ceea ce facem este să stabilim o limită relativă pe care o folosim pentru *a o respinge sau a nu o respinge.* Ipoteza nulă . Această limită este de obicei o valoare p de 0,05. Atunci când este aplicată analizei chi-pătrat , o valoare p mai mică de 0,05 înseamnă că probabilitatea obținerii unei deviații similare cu cea observată în grupul de rezultate doar din întâmplare este mai mică de 5%. O astfel de valoare p indică faptul că diferența dintre rezultatele observate și cele așteptate este semnificativă, ceea ce ne determină să respingem *ipoteza nulă.*

În schimb , valorile p egale sau mai mari de 0,05 (între 0,05 și 1,0) indică faptul că abaterea observată se va datora exclusiv întâmplării în 5 % sau mai mult din cazuri. Această concluzie ne permite să nu respingem ipoteza nulă (atunci când se utilizează p = 0,05 ca standard). Prin urmare , cu o valoare p de 0,26, nu vom respinge ipoteza nulă conform căreia transmiterea independentă explică rezultatele . În consecință , abaterea observată poate fi atribuită în mod rezonabil întâmplării .

(la)



(b)

gl	Probabilitate (p)					
		0,50	0,20	0,05	1 ex 01 1	0,001
1	0,02	0,46	1,64	3,84	6,64	10,83
2	0,21	1,39	3,22	5,99	9,21	13,82
3	0,58	2,37	4,64	7,82	11,35	16,27
4	1,06	3,36	5,99	9,49	13,28	18,47
5	1,61	4,35	7,29	11,07	15,09	20,52
6	2,20	5,35	8,56	12,59	16,81	22,46
7	2,83	6,35	9,80	14,07	18,48	24,32
8	3,49	7,34	11,03	15,51	20,09	26,13
9	4,17	8,34	12,24	16,92	21,67	27,88
10	4,87	9,34	13,44	18,31	23,21	29,59
15	8,55	14,34	19,31	25,00	30,58	37,30
25	16.47	24.34	30,68	37,65	44,31	52,62
50	37,69	49,34	58,16	67,51	76,15	86,60

Valorile lui Y²

■ Ipoteza nulă nu este respinsă.
Ipoteza nulă este respinsă.

A2 = 0,53

FIGURA 3.11 (a) Grafic pentru conversia valorilor *x2* în valori *p* . (b) Tabel de valori pentru x² pentru valori selectate *ale df şi p*. Valorile ui2 care produc valori *p* egale sau mai mari de 0,05 (zone colorate mai închise) justifică nerespingerea ipotezei nule . Valorile x² care produc valori *p* Valorile mai mici de 0,05 (zonele de culoare mai deschisă) justifică respingerea ipotezei nule. De exemplu, tabelul din partea (b) arată că pentru o valoare a lui *g²* *^ e 0,53 *cu* 1 grad de libertate, valoarea p corespunzătoare este între 0,20 *şi* 0,50. Graficul *(* a) oferă, prin interpolare, o valoare p mai precis, de 0,48. Prin urmare, nu respingem ipoteza nulă.

O ultimă considerație este potrivită aici cu privire la cazul în care ipoteza nulă este respinsă, adică atunci când $p < 0,05$. Să presupunem, de exemplu, că am testat un set de date pentru a verifica un posibil raport de 9:3:3:1, ca în Tabelul 3.3(b), dar că am respins ipoteza nulă pe baza calculelor efectuate. Ce interpretare alternativă a datelor putem face? Cercetătorul trebuie mai întâi să reconsidere ipotezele care stau la baza ipotezei nule. În încrucișarea noastră dihibridă, am presupus că segregarea acționează corect pentru ambele perechi de gene. De asemenea, am presupus că fertilizarea este aleatorie și că viabilitatea tuturor gameților este egală, indiferent de genotip - adică, că toți gameții au aceeași probabilitate de a participa la fertilizare. În cele din urmă, am presupus că, după fertilizare, toate stadiile pre-adulte și urmașii adulți sunt la fel de viabili, indiferent de genotipurile lor. Dacă oricare dintre aceste ipoteze este incorectă , atunci ipoteza inițială nu este neapărat greșită.

Un exemplu va clarifica acest lucru: să presupunem că ipoteza noastră nulă este că o încrucișare dihibridă între musculițe de fructe va avea ca rezultat musculițe mutante fără aripi în 3/16 cazuri. Cu toate acestea, acești embrioni mutanți ar putea avea o probabilitate mai mică de a supraviețui prin dezvoltarea larvară sau ca adulți tineri, comparativ cu musculițele ale căror genotipuri au ca rezultat aripi . Prin urmare, atunci când datele sunt colectate, proporția de musculițe fără aripi va fi mai mică de 3/16. Respingerea ipotezei

nule nu ar trebui să fie un motiv pentru a respinge validitatea postulatelor segregării și sortării independente , deoarece pot exista alți factori de care nu suntem conștienți și care afectează rezultatul.

ACUM REZOLVĂ ASTA

3.4 Într -una dintre încrucișările dihibride, Mendel a observat printre semințele F2 : 31,5 rotunde și galbene, 10,8 rotunde și verzi, 10,1 ridate și galbene și 32 ridate și verzi. Analizați aceste date folosind testul *chi-pătrat* pentru a verifica dacă

(a) Datele sunt în conformitate cu raportul 9:3:3:1.

(b) Relația dintre semințele rotunde și cele ridate se încadrează în raportul de 3:1.

(c) Raportul dintre semințele galbene și cele verzi se încadrează în raportul de 3:1 .

■ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea analizei* **chi-pătrat** *, în special utilizarea acesteia în verificarea faptului dacă un anumit set de date se încadrează într-o anumită proporție. Cheia rezolvării acestei probleme este de a determina mai întâi rezultatul așteptat pentru fiecare proporție prezisă. Apoi, pas cu pas, determinați abaterea în fiecare caz și apoi calculați și interpretați fiecare valoare* **x** *· pătrat .*

Mujer Varón Sexo desconocido

Individuos afectados

Părinți (fără rudenie)

Rude de sânge (înrudite)

Gemelos fraternos (dicigóticos)
Del sexo puede ser el mismo o distinto)

Hijos (en orden de nacimiento)

12 3 4

Genealogiile umane dezvăluie tipare de moștenire de personaje

Vom explora acum cum se determină modul de moștenire a fenotipurilor la oameni, unde nu este posibilă programarea împerecherilor și, în plus, numărul de urmași disponibili pentru studiu este relativ mic. Metoda tradițională de studiere a moștenirii a fost construirea de arbori genealogici, care indică prezența sau absența trăsăturii în cauză la membrii fiecărei generații. Astfel de arbori genealogici se numesc pedigree . Prin analizarea unui pedigree, putem încerca să prezicem cum este moștenită trăsătura pe care o studiem - de exemplu, se datorează unei alele dominante sau recesive? Atunci când sunt studiate mai multe pedigree pentru aceeași trăsătură, putem adesea determina modul de moștenire.

Acorduri referitoare la genealogii

Figura 3.12 prezintă câteva dintre convențiile utilizate de geneticieni la construirea pedigreelor. Cercurile indică femelele, iar pătratele indică masculii. Dacă sexul unui individ este necunoscut, se folosește un romb. Părinții sunt în general uniți printr-o singură linie orizontală , cu linii verticale care îi leagă de urmașii lor. Dacă părinții sunt înrudiți (adică, dacă sunt rude de sânge, cum ar fi verii primari), aceștia sunt uniți printr-o linie dublă. Toate grupurile

Gemelos idénticos (monocigóticos) (el sexo tiene que ser el mismo)

Múltiples individuos (no afectados)

Probando (en este caso un

Persoană decedată (în acest caz, femeie)

Purtători heterozigoți

I, II, III, etc. Generații succesive

FIGURA 3.12 Convenții utilizate în mod normal pentru genealogiile umane.

Descendenții sunt frați și sunt conectați printr-o linie orizontală , linia fraților. Frații sunt enumerați de la stânga la dreapta în funcție de ordinea nașterii și sunt etichetați cu cifre arabe. O cifră arabă este, de asemenea, folosită pentru a eticheta părinții. Fiecare generație este indicată cu cifre romane. Când o singură trăsătură este studiată într-un pedigree, cercurile, pătratele și romburile sunt haşurate dacă indivizii corespunzători exprimă fenotipul luat în considerare și sunt lăsate nehaşurate în caz contrar . În unele pedigree-uri, indivizii care nu exprimă o trăsătură recesivă , dar sunt cunoscuți ca fiind purtători heterozigoți, au un punct negru în interiorul cercului sau pătratului lor nehaşurat . Dacă un individ a murit și fenotipul său este necunoscut, o linie diagonală este trasată peste cerc sau pătrat.

Gemenii sunt indicați prin linii diagonale care pornesc de la o linie verticală conectată la linia de frați/surori . Pentru gemenii identici (sau monozigoți), liniile diagonale sunt unite printr -o linie orizontală . Gemenii

fraterni (sau dizigoți) nu au această linie de legătură. Un număr în interiorul unuia dintre simboluri reprezintă numeroși frați/surori de același sex cu același fenotip sau cu un fenotip necunoscut. Individul al cărui fenotip a atras atenția pentru cercetarea și construirea genealogiei se numește proband și este indicat printr-o săgeată cu „ p". Acest termen se aplică atât bărbaților, cât și femeilor.

Analiza genealogică

Figura 3.13 prezintă două genealogii. Primul este un pedigree reprezentativ pentru o trăsătură cu transmitere autosomal recesivă, cum ar fi albinismul, în care sinteza pigmentului melanină este blocată. Tatăl primei generații (I-1) este afectat. Este caracteristic unei trăsături recesive rare, cu un tată afectat, ca trăsătura să - „dispară" la urmașii generației următoare. Presupunând recesivitate, putem prezice că mama neafectată (1-2) a fost o femeie normală, homozigotă, deoarece niciunul dintre copiii ei nu prezintă această afecțiune. Dacă ar fi fost heterozigotă, s-ar fi așteptat ca jumătate dintre copiii ei să prezinte albinism, dar nu este cazul. Cu toate acestea, un eșantion atât de mic (trei urmași) face imposibilă cunoașterea acestui lucru cu certitudine.

Noi dovezi susțin ipoteza că albinismul este o trăsătură recesivă. Dacă albinismul ar fi moștenit într-o manieră dominantă, individul II-3 ar trebui să exprime trăsătura pentru a o transmite urmașilor săi (III-3 și III-4), dar nu se întâmplă acest lucru. Inspecția urmașilor care constituie a treia generație (rândul III) oferă un sprijin suplimentar pentru ipoteza că albinismul este o trăsătură recesivă. Dacă acesta este cazul, părinții II-3 și II-4 sunt heterozigoți, iar aproximativ un sfert dintre urmașii lor ar trebui să exprime trăsătura. Doi dintre cei șase urmași prezintă albinism. Această abatere de la proporția așteptată nu este neobișnuită în încrucișările cu puțini urmași. Odată ce suntem siguri că albinismul este moștenit ca o trăsătură autosomal recesivă, am putea marca indivizii II-3 și II-4 cu un punct negru în interiorul pătratului și cercului lor. În cele din urmă, putem observa că o caracteristică a pedigree-urilor pentru trăsăturile autozomale este că atât masculii, cât și femelele sunt afectați cu probabilitate egală. În Capitolul 4, vom examina un pedigree care reprezintă o genealogie situată pe cromozomul X, care determină sexul. Vom observa anumite modele caracteristice de transmitere a trăsăturilor legate de X, cum ar fi faptul că aceste trăsături sunt mai răspândite la urmașii de sex masculin și nu sunt niciodată transmise de la părinții de sex masculin afectați la fiii lor.

Al doilea pedigree ilustrează modelul de moștenire al bolii Huntington, cauzată de o alelă autosomal dominantă. Cheia identificării pedigree-urilor

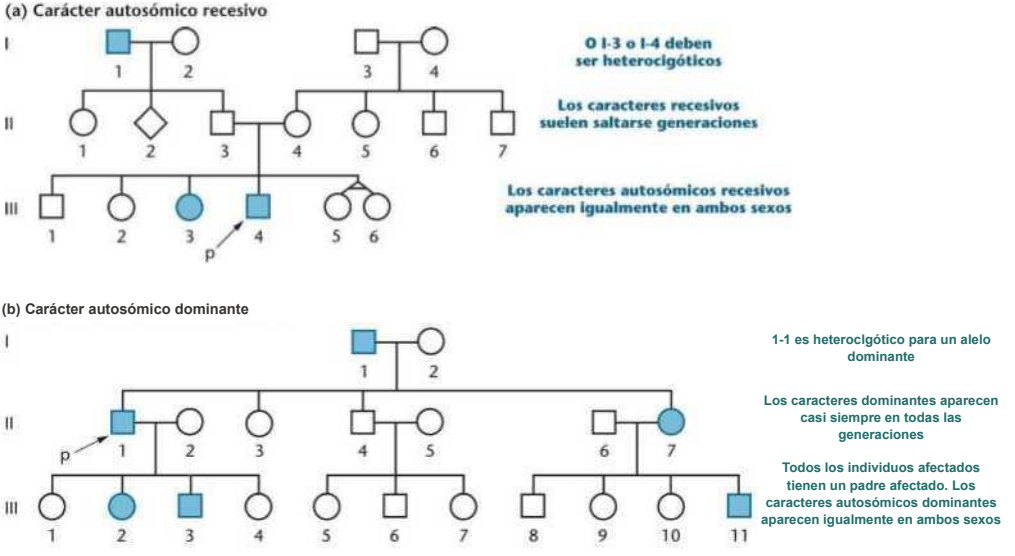


FIGURA 3.13 Genealogías representativas para dos características, cada una de las cuales se sigue durante tres generaciones.

care se referă la o trăsătură dominantă este că toți copiii afectați vor avea cel puțin un părinte afectat . De asemenea, este posibil ca, din întâmplare, niciunul dintre copii să nu moștenească alela dominantă. În acest caz, trăsătura nu va exista în generațiile ulterioare. Ca și în cazul trăsăturilor recesive , bărbații și femeile vor fi afectați în mod egal, presupunând că gena este autosomală.

Atunci când o boală autozomal dominantă este rară într -o populație - și majoritatea sunt - atunci este foarte puțin probabil ca indivizii afectați să moștenească o copie a genei mutante de la ambii părinți. Prin urmare , în majoritatea cazurilor, indivizii afectați vor fi heterozigoți pentru alela dominantă . Prin urmare , aproximativ jumătate dintre urmașii lor o vor moșteni . Acest lucru este confirmat în al doilea pedigree din Figura 3.13. Mai mult, dacă o mutație este dominantă și o singură copie este suficientă pentru a produce fenotipul mutant, homozigoții sunt probabil și mai grav afectați și este posibil să nu supraviețuiască. Un exemplu în acest sens este gena dominantă pentru hipercolesterolemia familială. Heterozigoții au un defect al receptorilor pentru lipoproteinele cu densitate mică, numite LDL (cunoscut în mod obișnuit ca „colesterol rău"). Drept urmare, celulele sanguine absorb prea puțin colesterol și , prin urmare, nivelurile de LDL din plasmă sunt crescute. Dacă nu sunt tratați, acești indivizi heterozigoți suferă adesea atacuri de cord la 40 de ani sau chiar mai devreme. În timp ce heterozigoții au niveluri de LDL de aproximativ două ori mai mari decât cele ale unui individ normal , indivizii homozigoți au fost rareori detectați . Aceste persoane sunt complet lipsite de receptori LDL și au niveluri de LDL de aproape zece ori mai mari decât în mod normal. Au o probabilitate mare de a suferi atacuri de cord foarte devreme, chiar înainte de vârsta de cinci ani și aproape inevitabil înainte de a ajunge la douăzeci de ani.

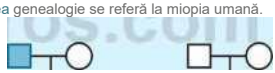
Analiza pedigreelor pentru trăsături multiple a fost dintotdeauna o tehnică de cercetare valoroasă în genetica umană. Cu toate acestea , această abordare nu oferă de obicei certitudinea obținută prin tragerea concluziilor din încrucișări concepute pentru a produce un număr mare de urmași. Cu toate acestea, atunci când sunt analizate mai multe pedigree independente pentru aceeași trăsătură sau tulburare, se pot trage adesea concluzii consistente . Tabelul 3.4 enumeră diverse trăsături umane, clasificate în funcție de expresia lor dominantă sau recesivă .

Cele mai reprezentative trăsături recesive și dominante la specia umană

Acondroplazie, brahidactilie, cecitate nocturnă staționară congenitală
Distrofie miotonică, boala Huntington, sindromul gustativ
Feniltiocarbamidă Hipercolesterolemie Hipotricoză Neurofibromatoză
Porfirie (unele forme) Sindrom Ehlers-Danlos Sindrom Marfan

ACUM REZOLVĂ ASTA

3.5 Următoarea genealogie se referă la miopia umană.



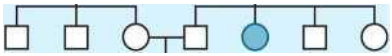
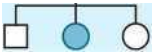


TABLA 3.4

Caracteres recesivos	Caracteres dominantes
Albinismo Alcaptonuria Anemia falciforme	
Ataxia telangiectasia Ceguera para los colores Distrofia muscular de Duchenne Enfermedad de Tay-Sachs Fenilcetonuria Fibrosis quística Galactosemia Hemofilia Síndrome de Lesch-Nyhan	



Preziceți dacă această anomalie este moștenită ca urmare a unei trăsături dominante sau recesive. Determinați cel mai probabil genotip pentru fiecare individ pe baza predicției dumneavoastră.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică analizarea unui pedigree pentru a determina modul de moștenire a miopiei. Cheia soluției sale constă în verificarea existenței unor indivizi care exprimă trăsătura, dar ai căror părinți nu o exprimă. Dacă da, aceasta este o informație foarte revelatoare, permițându-ne să excludem unul dintre modurile de moștenire.*

E

DE GENOMICĂ

Moștenirea mendeliană online la om

Área de estudio. Exploración de la Genómica

L. Baza de date Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) este un catalog de gene umane și boli genetice umane care sunt moștenite în mod mendelian. Bolile genetice datorate aberațiilor cromozomiale severe, cum ar fi monosomia sau trisomia (pierderea unui cromozom sau, respectiv, prezența unui cromozom superfluu), nu sunt incluse. Baza de date OMIM este o versiune actualizată zilnic a cărții *Mendelian Inheritance in Man,* editată de Dr. Victor McKusick de la Universitatea Johns Hopkins. Oamenii de știință folosesc OMIM ca una dintre sursele fundamentale de informații care completează datele de secvențiere generate de Proiectul Genomului Uman.

Intrările din OMIM oferă linkuri către o multitudine de informații, inclusiv secvențe de ADN și proteine, hărți cromozomiale, descrieri ale bolilor și publicații științifice relevante. În acest exercițiu, veți explora OMIM pentru a răspunde la întrebări despre o boală recesivă umană, anemia falciformă, precum și despre alte boli care sunt moștenite pe cale mendeliană.

■ Exercițiul I. Anemia falciformă

În acest capitol am introdus trăsăturile umane recesive și dominante . Vom afla acum mai multe despre anemia falciformă, o boală autosomal recesivă, explorând baza de date OMIM.

1. Pentru a începe căutarea, accesați site-ul web OMIM la adresa: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar.
2. În caseta „CĂUTARE”, tastați „anemie cu celule bolnave” și faceți clic pe butonul „Start” pentru a efectua căutarea.
3. Selectați prima intrare (#603903).
4. Examinați lista cu două subiecte din coloana din stânga și citiți câteva informații despre anemia falciformă .
5. Selectați una sau două referințe din partea de jos a paginii și urmați -le pentru a accesa rezumatele publicate în PubMed.
6. Folosind informațiile din această intrare, răspundeți la următoarele întrebări:

   a. Care este gena mutată la persoanele care suferă de anemie falciformă ?

   b. Care sunt principalele simptome ale acestei boli?

   c. Care a fost prima descriere științifică publicată a anemiei falciforme?

   d. Descrieți alte două caracteristici ale acestei boli pe care le-ați aflat din baza de date OMIM și precizați unde ați găsit informațiile în baza de date .

■ Exercițiul II. Alte boli recesive sau dominante

Selectați o altă boală umană care este moștenită ca trăsătură recesivă sau dominantă și investigați caracteristicile acesteia , urmând procedura generală tocmai prezentată . Urmați linkurile de la OMIM către alte baze de date, dacă doriți.

Descrieți diverse informații de interes pe care le-ați adunat în timpul explorării și citați sursele de informații pe care le-ați găsit în timpul căutării.

I. STUDIU DE CAZ | A încerca sau a nu încerca

Thomas a descoperit o parte potențial îngrozitoare a istoriculuI familiei sale când a aflat de diagnosticul medical al fratelui său, care a relevat demență progresivă, rigiditate musculară crescândă și convulsii mai frecvente . Fratele său în vârstă de 49 de ani a fost diagnosticat cu boala Huntington (HD), o afecțiune moștenită dominant care începe de obicei să se manifeste cu aceste simptome în jurul vârstei de 45 de ani, ducând la deces la scurt timp după 60 de ani . Deși vestea a fost devastatoare pentru Thomas , ea a ajutat cel puțin la explicarea sinuciderii tatălui său . Acum , în vârstă de 38 de ani, Thomas se întreabă cât de probabil este să fie purtător al genei Huntington și discută cu soția sa despre avantajele și dezavantajele testării genetice . Thomas și soția sa au doi copii adolescenți, un băiat și o fată.

1. Ce rol poate juca un consilier genetic în acest caz real?
2. Cum pot ajuta pregătirea și analiza unei genealogii familiale la explicarea dilemei cu care se confruntă Thomas și familia sa?
3. Dacă Thomas decide să se supună unor teste genetice , ce rol ar trebui să joace sectorul asigurărilor de sănătate în astfel de cazuri ?
4. Dacă Thomas este testat pozitiv pentru boala Huntington și ești unul dintre copiii lui , ai dori și tu să fii testat ?

Puncte de rezumat

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

1. Principiile lui Mendel ne ajută să descriem baza moștenirii trăsăturilor fenotipice. Pe baza analizei numeroaselor încrucișări monohibride, el a emis ipoteza că factorii ereditari apar în perechi și prezintă relații de dominanță/recesivă în determinarea exprimării trăsăturilor. Mendel a postulat, de asemenea, că factorii se separă în timpul formării gameților, astfel încât fiecare gamet primește doar unul dintre cei doi factori, cu probabilitate egală.
2. Principiul segregației independente a lui Mendel, bazat inițial pe analiza sa a încrucișărilor dihibride, afirmă că fiecare pereche de factori se segregă independent de orice altă pereche. Prin urmare , toate combinațiile posibile de gameți se vor forma cu probabilitate egală.
3. Pentru a prezice probabilitatea fenotipurilor și genotipurilor în încrucișările pentru două sau mai multe perechi de gene, se utilizează metoda pătratului Punnett și metoda diagramei de ramificare. Metoda diagramei de ramificare este la fel de precisă ca pătratul Punnett și este mai puțin complexă.
4. Descoperirea cromozomilor spre sfârșitul secolului al XIX-lea și studiile ulterioare asupra comportamentului lor în timpul meiozei au dus la o renaștere a operei lui Mendel , care a pus în legătură factorii genetici cu cromozomii.
5. Proporțiile genetice sunt exprimate ca probabilități. Prin urmare, pentru a obține rezultate din încrucișări genetice, este necesar să se înțeleagă legile probabilității .
6. Testul chi-pătrat ne permite să verificăm ipoteza nulă, care afirmă că nu există diferențe reale între valorile observate și cele așteptate. Această analiză verifică probabilitatea ca variațiile observate să poată fi atribuite unor abateri aleatorii .
7. Analiza genealogică este o metodă de studiere a tiparelor de moștenire a trăsăturilor la oameni pe parcursul mai multor generații. Această analiză oferă baza pentru determinarea modului de moștenire a bolilor și trăsăturilor atunci când nu se pot efectua încrucișări genetice extinse și un număr mare de urmași nu este disponibil.

IDEI ȘI SOLUȚII

Ca student, va trebui să vă demonstrați cunoștințele despre genetica moștenirii prin rezolvarea diverselor probleme. Succesul în această sarcină necesită nu doar înțelegerea teoriei, ci și aplicarea acesteia în situații genetice mai practice. Majoritatea studenților consideră rezolvarea problemelor de genetică o provocare, dar și un exercițiu foarte stimulant . Această secțiune este concepută pentru a oferi perspective de bază asupra procesului de raționament necesar pentru rezolvarea problemelor.

de genetică sunt în multe privințe similare cu problemele de algebră formulate sub formă de cuvinte. Abordarea este identică: (1) analizați cu atenție problema ; (2) traduceți cuvintele în simboluri , definind fiecare simbol cu precizie; și (3) alegeți și aplicați o tehnică specifică pentru a rezolva problema. Primii doi pași sunt cei mai importanți. Al treilea pas este în mare măsură mecanic.

mai simple probleme sunt cele care oferă toate informațiile necesare despre generație și ne cer să găsim proporțiile așteptate ale genotipurilor și/sau fenotipurilor în generațiile F. Când întâlniți o problemă de acest tip, urmați întotdeauna această procedură:

(a) Determinați pe cât posibil genotipurile indivizilor din generația Pt .
(b) Determinați ce gameți îi poate forma părinții P.
(c) Recombinați gameții folosind metoda pătratului Punnett sau metoda diagramei de ramificare sau , dacă situația este foarte simplă, prin inspecție. Din genotipurile generației F_j , determinați - fenotipurile. Citiți fenotipurile generației F ₁ .
(d) Repetați procesul pentru a obține informații despre generația Fj.

Determinarea genotipurilor pe baza informațiilor furnizate necesită înțelegerea bazei teoretice a geneticii transmiterii . De exemplu, să luăm în considerare următoarea problemă: La *Drosophila, o alelă mutantă recesivă, neagră , are ca rezultat o culoare a corpului foarte închisă atunci când este homozigotă. Culoarea normală a tipului sălbatic este gri. Dacă o femelă neagră este încrucișată cu un mascul gri al cărui tată era negru, ce raport fenotipic ar fi de așteptat în F1?*

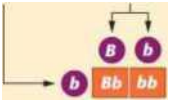
Pentru a rezolva această problemă, trebuie să înțelegeți conceptele de dominanță și recesivitate, precum și principiul segregării. În plus, trebuie să utilizați informații despre tatăl masculului. O modalitate logică de a rezolva problema este:

Deoarece femela este *de culoare,* ea trebuie să fie homozigotă pentru alela mutantă (bb). Masculul este gri; prin urmare, trebuie să aibă cel puțin o alelă dominantă (B). Deoarece tatăl său era *negru (bb),* Masculul a primit unul dintre cromozomii care poartă acea alelă, deci trebuie să fie heterozigot *(Bb).*

De aici , rezolvarea problemei este foarte simplă:

bb

Hembra negro Macho gris
homocigótica heterocigótico



1/2 din heterozigoții
gri *Bb,*
masculi și femele

► F] 1/2 dintre masculii și femelele

homozigote negre, *bb*

Aplicați abordarea pe care tocmai am explicat-o la următoarele - probleme.

1. În studiul său cu mazărea, Mendel a descoperit că păstăile umflate erau dominante față de păstăile ridate, în timp ce semințele rotunde erau dominante față de semințele ridate . Una dintre încrucișările sale a fost între plante cu păstăi umflate și semințe rotunde și plante cu păstăi ridate și semințe ridate. Din această încrucișare, el a obținut o generație F1 constând în întregime din plante cu păstăi umflate și semințe rotunde. În generația F2 . Mendel a obținut raportul clasic 9 :3:3: 1. Folosind informațiile de mai sus, determinați rezultatele așteptate în generațiile F1 și F2 pentru o încrucișare între plante homozigote cu păstăi ridate și semințe rotunde și plante cu păstăi umflate și semințe ridate.

Soluție. Mai întâi, definiți simbolurile pentru genele fiecărei perechi de trăsături alternative. Folosiți prima literă a trăsăturii recesive, cu literă mică, pentru a desemna acele trăsături și folosiți aceeași literă cu literă mare pentru a desemna trăsăturile dominante. De exemplu, folosiți *Aya* pentru a desemna fenotipurile umflat și ridat, *iar* Ryr pentru rotund și respectiv ridat.

Acum determinați genotipurile generației P , formați gameții, combinați - i în generația F și determinați fe-
notificări:

Pi :	*aaRR*	X	*AArr*
	ridat, rotund		umflat, aspru
	I		I
Gameți	*RA*		Ar
Fs		*AaRr*	
		umflat, rotund	

Este imediat evident că generația F2 exprimă ambele fenotipuri dominante și este heterozigotă pentru ambele perechi de gene. Prin urmare , ne putem aștepta ca generația F2 să producă raportul mendelian clasic de 9:3:3:1. Să calculăm însă acest lucru pentru a-l confirma, folosind metoda diagramei de ramificare. Deoarece ambele perechi de gene sunt heterozigote și se poate aștepta ca acestea să fie moștenite independent, putem prezice rezultatele F2 separat pentru fiecare pereche de gene și apoi putem continua cu metoda diagramei de ramificare.

Descendenții lui F ar trebui să prezinte diferitele trăsături individuale în următoarele proporții:

Aa X *Aa*

!

AAÌ

Au > umflat

AA J

ridat *aa*

Rr X *Rr*

I

MÌ

Rr > redondo

rR I

rr rugoso

1. Metoda diagramei de ramificare ne permite să confirmăm raportul fenotipic 9:3:3: 1. (Reamintim că acest raport reprezintă rapoartele reale de 9/16:3/16:3/16:1/16). Rețineți că aplicăm regula produsului pentru a calcula probabilitățile finale:

/ ---------3/4 rotund ■ <3/4M3/4 ?» 9/16 umflat, rotund
umflat pe 3/4
1/4 ------aspru , 3/16 umflat, aspru

și --------3/4 rotunde ————> 3/16 ridate, rotunde
1/4 încrețit
-------1/4 grosime , grosime , 1/16 încrețit , gros

2. Într -o altă încrucișare între două plante parentale cu genotip și fenotip necunoscute s-au obținut următorii urmași .

3/8 umflat, rotund 3/8 umflat, aspru 1/8 ridat, rotund 1/8 ridat, aspru
Determinați genotipul și fenotipul părinților .

Soluție. Această problemă este mai dificilă și necesită o gândire mai ascuțită , deoarece trebuie să lucrați înapoi pentru a obține răspunsul. Cea mai bună abordare este de a lua în considerare rezultatele referitoare la forma păstăii independent de cele referitoare la textura semințelor .

Dintre toate plantele, 3/8 + 3/8 = 3/4 au păstăi umflate , iar 1/8 + 1/8 = 1/4 au păstăi ridate. Dintre diferitele combinații genotipice care ar putea servi drept părinți, care va da un raport de 3/4:1/4? Deoarece acest raport este identic cu rezultatul lui Mendel pentru un monohibrid F1 , putem deduce că ambii părinți necunoscuți au aceleași caracteristici genetice ca și părinții F1 în cazul monohibridului: ambii trebuie să fie heterozigoți pentru gena care controlează forma păstăii și, prin urmare, sunt Aa .

Înainte de a accepta această ipoteză, să luăm în considerare posibilele combinații genotipice care controlează textura semințelor . Dacă luăm în considerare această trăsătură separat, putem observa că trăsăturile se regăsesc în raportul 3/8 + 1/8 - 1/2 rotund : 3/8 + 1/8 = 1/2 ridat. Pentru a obține un astfel de raport , părinții *nu pot* fi ambii heterozigoți , deoarece atunci urmașii lor s-ar găsi în raportul fenotipic 3/4: 1/4. Nici ambii *nu pot fi* homozigoți, deoarece atunci toți urmașii ar exprima un singur fenotip. Prin urmare, rămânem cu ipoteza că un părinte este homozigot , iar celălalt heterozigot pentru alelele care controlează textura. Cazul posibil *RR* x *Rr* nu funcționează, deoarece ar produce, de asemenea, un singur fenotip . Acest lucru ne lasă cu singurul caz posibil *Rr.* X *rr.* Descendenții unei astfel de încrucișări vor fi în raportul 1/2 *Rr* (rotund):l/2 rr (rugos), exact rezultatul observat de noi .

Să combinăm acum ipotezele noastre și să prezicem rezultatul - încrucișării . În soluția noastră , vom folosi o cratimă (-) pentru a indica faptul că a doua alelă poate fi fie dominantă, fie recesivă , deoarece prezicem doar fenotipurile :

/ ---------1/2 *Rr* —» 3/8 *A-Rr* umflat, rotund

3/4 A—

> ------1/2 rr —> 3/8 A—rr umflat, rugos

/ ---------1/2 *Rr* —► 1/8 *aaRr* ridat, rotund

3/4 *aa*

\ ---------1/2 rr — » 1/2 rr ridat, aspru

După cum puteți vedea, această încrucișare produce urmași conform informațiilor furnizate, rezolvând astfel problema. Rețineți că în această soluție am folosit genotipuri în metoda diagramei de ramificare , spre deosebire de utilizarea fenotipurilor în soluția primei probleme.

3. În laborator, o studentă la genetică a încrucișat muște normale cu aripi lungi cu muște mutante *plinuțe* , despre care credea că este o trăsătură recesivă. În generația F1, toate mușteleaveau aripi lungi. Generația F2 a dat următoarele rezultate:

   792 de muște cu aripi lungi

   și
   208 muște cu aripi *îndesate*

   Studentul a testat ipoteza că aripile *dulci* sunt moștenite ca o trăsătură recesivă, efectuând o analiză a datelor F2 .

   (a) Ce proporție a propus elevul?
   (b) A susținut analiza lui x* ipoteza?
   (c) Ce sugerează datele despre mutația „*dumpy*"?

   Soluţie

   (a) Studentul a propus ipoteza că datele F2 (792:208) se încadrează în raportul de monohibriditate mendeliană de 3:1 pentru genele recesive.
   (b) Pasul inițial în analiza lui x^2 este calcularea rezultatelor așteptate (e) presupunând raportul 3:1. Apoi se calculează abaterile *o - e(d) și* valorile rămase .

Proporţie	0	şi	*d*	d2	de
3/4	792	750	42	1764	2,35
1/4	208	250	-42	1764	7.06

Total = 1000

$$\chi^2 = \Sigma \frac{d^2}{d}$$

= 2,35 + 7,06

Referindu-ne la Figura 3.11, putem calcula probabilitatea (p) și putem decide dacă abaterile de la ipoteza nulă pot fi atribuite întâmplării . Există două rezultate posibile (n), deci gradele de libertate sunt (g/) = *n* - 1, adică 1. Tabelul din Figura 3.11(b) arată că *p este* o valoare între

= 10(27/64)-(1/16)

= 9,41 între 0,01 și 0,001. Graficul din Figura 3.11 (a) oferă o estimare de aproximativ 0,001. Deoarece *p* < 0,05, respingem ipoteza nulă. Datele nu se încadrează în raportul 3:1.

(c) Când eleva a emis ipoteza că raportul mendelian de 3:1 era o expresie validă pentru acea încrucișare monohibridă, ea făcea numeroase presupuneri. Examinarea acestor presupuneri subiacente poate explica de ce ipoteza nulă a fost respinsă . Rețineți că eleva a presupus că toate genotipurile rezultate din încrucișare erau la fel de viabile; adică , că genotipurile care produc aripi lungi au aceeași probabilitate de a supraviețui de la fertilizare până la vârsta adultă ca și genotipurile care produc *aripi lungi.* Un studiu mai detaliat ar dezvălui că *muștele* grase Sunt ceva mai puțin viabile decât muștele normale . Prin urmare, ar fi de așteptat ca mai puțin de 1/4 din totalul urmașilor să manifeste trăsătura „îndulcită " . Această observație este dedusă din date, deși nu am dovedit că este adevărată.

4. Dacă doi părinți, ambii purtători heterozigoți ai unei gene autozomal recesive pentru fibroza chistică, au cinci copii, care este probabilitatea ca exact trei să fie normali?

   Soluție. Această problemă ne oferă oportunitatea de a utiliza teorema binomială . Pentru a face acest lucru, trebuie să folosim două fapte pe care le știm deja : probabilitatea de a avea un copil normal în fiecare sarcină este

   $$p_a = \text{normal} — 3/4$$

   și că probabilitatea de a avea un copil afectat este

   $$p_b = \text{afectat} = 1/4$$

   Prin introducerea acestor date în formulă,

   -¿ra'b
   s!t!

   unde n = 5, s = 3 și t = 2

   (5) • (4) • (3) ■ (2) • (1)
   (3) • (2) • (1) • (2) • (1)

   (5) • (4) t , = (2F(ÎÏ (3/4)(1/4)

   = 10(27/1024) (3/4)\l/4)^2

   = 270/1024

   p = -'•'0,26

Problemas y preguntas para la discusión

Când rezolvați probleme de genetică din acest capitol și din următoarele, presupuneți întotdeauna că membrii generației Pt sunt homozigoți, cu excepția cazului în care informațiile furnizate sau datele prezentate indică altfel.

DE CUM ŞTIM?

1. În acest capitol ne-am concentrat pe principiile lui Mendel , legile probabilității și analiza genealogică

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

Am văzut, de asemenea, câteva dintre metodele și formele de -raționament care au permis dezvoltarea acestor idei, concepte și tehnici . Luând în considerare aceste explicații , ce răspuns ați da la următoarele întrebări?

(a) Cum a reușit Mendel să deducă principiile care guvernează comportamentul „ factorilor genetici" în timpul formării gameților, dacă nu a putut observa direct acești factori?

(b) Cum putem spune dacă un organism care exprimă o trăsătură dominantă este homozigot sau heterozigot?

(c) Când analizăm date genetice, cum știm dacă abaterea de la proporția așteptată se datorează întâmplării sau unui alt factor independent ?

(d) Din moment ce nu putem efectua încrucișări experimentale la oameni, cum știm cum sunt moștenite trăsăturile ?

2. Într-o încrucișare între un cobai negru și unul alb, toți indivizii din generația F1 sunt negri. Generația F2 este formată din aproximativ 3/4 cobai negri și 1/4 cobai albi.

(a) Desenați o diagramă a încrucișării, arătând genotipurile și fenotipurile .

(b) se încrucișează doi cobai albi F2 , cum va fi urmașii?

(c) Două încrucișări diferite au fost realizate între cobai negri din generația F, rezultatele fiind prezentate mai jos .

Încrucișarea	urmașilor
Cruce 1	Tot negru
Cruce 2	3/4 neagră, 1/4 albă

Desenați o diagramă a fiecărei intersecții.

3. La oameni , albinismul este moștenit ca o trăsătură recesivă simplă. Pentru următoarele familii, determinați genotipurile părinților și ale urmașilor. (Când sunt posibile două genotipuri alternative, menționați-le pe ambele .)

(a) Doi părinți normali au cinci copii, patru normali și unul albino.

(b) Un bărbat normal și o femeie albinoasă au șase copii, toți normali.

(c) Un bărbat normal și o femeie albinoasă au șase copii, trei normali și trei albinoși.

(d) Desenați arborele genealogic al familiilor (b) și (c). Presupuneți că unul dintre copiii normali ai familiei (b) se căsătorește cu un copil albino din

(c) și că au opt copii. Extindeți pedigree-ul pentru a-i include, anticipând fenotipurile lor (normal sau albino).

4. Care dintre postulatele lui Mendel sunt ilustrate în genealogia Problemei 3? Enumerați și definiți aceste postulate.

5. încrucișărilor monohibride ale lui Mendel au servit drept bază pentru toate postulatele sale, cu excepția unuia . Care postulat nu s-a bazat pe aceste rezultate? De ce?

6. Ce avantaje a obținut Mendel alegând mazărea de grădină pentru experimentele sale?

7. Mendel a încrucișat mazăre cu semințe rotunde și cotiledoane galbene (frunzele semințelor) cu mazăre cu semințe ridate și cotiledoane verzi. Toate plantele F1 aveau semințe rotunde și cotiledoane galbene. Reprezentați schematic încrucișarea până la generația F1, folosind atât metoda pătratului Punnett, cât și schema diagramei de ramificare .

8. Pe baza încrucișării anterioare , care este probabilitatea ca un organism din generația F2 Are semințe rotunde și cotiledoane verzi *și* este de rasă pură ?

9. Care dintre postulatele lui Mendel poate fi demonstrată doar în încrucișări care implică cel puțin două perechi de trăsături? Definiți postulatul .

10. cele patru postulate ale lui Mendel cu ceea ce se știe acum despre cromozomii omologi, gene, alele și meioză.

11. Care este baza omologiei dintre cromozomi ?

12. La *Drosophila,* culoarea *gri* a corpului este dominantă față de *cea abanosului* , în timp ce *aripile* lungi sunt dominante față de aripile *vestigiale* . Presupunând că indivizii P| sunt homozigoți, rezolvați următoarele încrucișări până la generația F2 și determinați raporturile genotipice și fenotipice în fiecare generație .

(a) gri, X-uri lungi de abanos, vestigiale

(b) gri, vestigial X abanos, lung

(c) gri, X-uri lungi gri, vestigiale

13. Câte tipuri diferite de gameți se pot forma din indivizi cu următoarele genotipuri: (a) *AaBb,* (b) *AaBB,* (c) *AaBbCc,* (d) *AaBBcc,* (e) *AaBbcc* și (f) *AaBbCcDdEe?* Care sunt gameții în fiecare caz?

14. Mendel a încrucișat mazăre cu semințe verzi cu mazăre cu semințe galbene. Generația F1 A produs doar semințe galbene . În generația F2 , urmașii au constat din 6.022 de plante cu semințe galbene și 2.001 de plante cu semințe verzi. Dintre plantele F2 cu semințe galbene , 519 s-au autofecundat, cu următoarele rezultate: 166 s-au comportat ca rasă pură pentru galben , iar 353 au avut ca rezultat un raport Fj de 3/4 galben: 1/4 verde. Explicați aceste rezultate desenând o diagramă a încrucișărilor .

15. Într-un studiu efectuat pe cobai negri și albi, 100 de cobai negri au fost încrucișați cu 100 de cobai albi , iar fiecare încrucișare a produs o -generație F1 . În 94 dintre cazuri, indivizii F1 erau toți negri, iar raportul în F2 a fost de 3 negri : 1 alb . În celelalte 6 cazuri, jumătate dintre animalele F1 erau negre, iar cealaltă jumătate albe. De ce? Preziceți rezultatele încrucișării dintre cobai negri și albi F1 din aceste 6 cazuri excepționale.

16. Mendel a încrucișat mazăre cu semințe rotunde, verzi, cu altele cu semințe galbene, ridate. Toate plantele F1 au avut semințe rotunde, galbene. Preziceți rezultatele unei încrucișări de testare a acestor plante F1 .

17. Talasemia este o tulburare ereditară la om care provoacă anemie. Persoanele afectate prezintă anemie ușoară sau severă. Presupunând că o singură genă cu două alele este implicată în moștenirea acestei tulburări, este talasemia o tulburare dominantă sau recesivă?

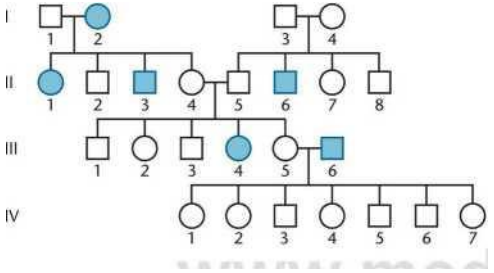
18. Următoarele prezintă rezultatele F2 a două încrucișări Mendel monohibride.

(a) Păstăi umflate	882
Păstăi ridate	299
(b) Flori violete	705
Flori albe	224

-o folosind analiza x^2 - Calculați valoarea lui **x^2 și** determinați

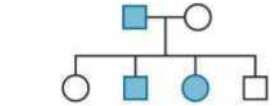
valoarea *p* pentru ambele încrucișări. Interpretați valorile p . Pot fi abaterile din fiecare caz atribuite întâmplării sau nu? Care dintre cele două încrucișări prezintă o abatere mai mare?

19. O cercetătoare, verificând date distribuite în două clase fenotipice, a observat valori de 250:150. A decis să efectueze o analiză chi- pătrat . Folosind două ipoteze nule diferite : (a) datele se încadrează în raportul 3:1 și (b) datele se încadrează în raportul 1:1. Calculați valorile lui x^2P pentru fiecare ipoteză. Ce se poate concluziona despre fiecare ipoteză?
20. Baza pentru respingerea oricărei ipoteze nule este arbitrară. Cercetătorul poate stabili standarde mai mult sau mai puțin stricte, crescând sau scăzând valoarea p . utilizat pentru a respinge sau nu ipoteza . În cazul analizei chi-pătrat a încrucișărilor genetice, utilizarea unui standard *p* = 0,10 ar fi mai mult sau mai puțin strictă în ceea ce privește nerespingerea ipotezei nule? Explicați.
21. Luați în considerare următoarea genealogie.

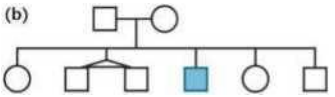


Preziceți modul de moștenire a trăsăturii pe care o analizăm și cel mai probabil genotip al fiecărui individ. Presupuneți că alelele *Aya* controlează expresia trăsăturii.

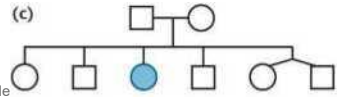
22. Trageți toate concluziile posibile privind modul de moștenire a - caracterului indicat în fiecare dintre următoarele genealogii parțiale (fiecare dintre cele patru cazuri se bazează pe un caracter diferit).



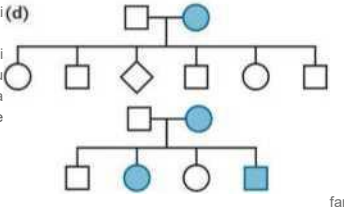
(b)



(c)



(d)



23. Într-o familie cu cinci copii, care este probabilitatea ca
    (a) Sunt toți bărbați?
    (b) Sunt trei dintre ei bărbați și două femei?
    (c) Doi dintre ei sunt bărbați și trei femei?
    (d) Au toți același sex?

    Presupunem că probabilitatea de a avea un fiu este aceeași cu probabilitatea de a avea o fiică (p = 1/2).
24. Într-o familie cu opt copii, în care ambii părinți sunt heterozigoți pentru albinism , ce expresie matematică ar prezice probabilitatea ca șase să fie normali și doi să fie albinoși?
25. Timp de decenii, oamenii de știință au fost nedumeriți de diferitele circumstanțe care înconjoară familiile cu neuropatie auditivă (surditate) rară, cu debut precoce. În unele familii , părinții și bunicii probandului au auz normal, în timp ce în alte familii, mai mulți membri afectați (surzi) sunt împrăștiați în arborele genealogic, apărând în fiecare generație. Presupunând o cauză genetică în ambele cazuri, se oferă o explicație rezonabilă pentru originea genetică a unei astfel de surdități în aceste două tipuri de familii.
26. O instanță americană a audiat recent un caz de „naștere necorespunzătoare" în care un copil cu sindromul Smith-Lemli-Opitz s-a născut din părinți aparent sănătoși . Sindromul este caracterizat printr-o serie de malformații congenitale, inclusiv palatoschizis și diverse probleme cu sistemele reproducător și urinar. Medicul de familie a crezut inițial că tulburarea nu era genetică, așa că părinții au decis să aibă un alt copil, care s-a născut, de asemenea, cu sindromul Smith-Lemli-Opitz. Presupunând că sunteți consilier genetic , explicați instanței ce s -a întâmplat, inclusiv probabilitatea ca părinții să aibă doi copii afectați, având în vedere că acest sindrom este moștenit ca o trăsătură recesivă.

Problemas extrapicantes

27 Două plante de mazăre de rasă pură sunt încrucișate. Un părinte este rotund, terminal, violet și ridat, în timp ce celălalt exprimă fenotipurile alternative ridat, axial, alb și umflat. Cele patru perechi de trăsături alternative sunt reglate de patru gene, fiecare situată pe un cromozom diferit . În generația F1, au fost exprimate doar trăsăturile rotund, axial, violet și umflat. În generația F2 ... au fost exprimate toate opiniile posibile

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com combinații ale acestor caractere conform moștenirii mendeliene .

(a) Ce concluzii putem trage despre moștenirea acestor trăsături, pe baza rezultatelor F1 ?

(b) În rezultatele F2 , care fenotip va apărea cel mai frecvent ? Scrieți o expresie matematică care prezice probabilitatea apariției acelui fenotip.

(c) În rezultatele F2 , care fenotip va apărea cel mai rar? Scrieți o expresie matematică care prezice această probabilitate.

(d) În generația F2 , care este probabilitatea ca fiecare dintre cele două fenotipuri P | să apară ?

(e) Dacă s-ar face o încrucișare de testare cu plantele F1 , câte fenotipuri diferite ar apărea? Cum se compară acest număr cu numărul de fenotipuri diferite din generația F2 pe care am analizat-o anterior ?

28. Boala Tay-Sachs (TSD) este o tulburare metabolică congenitală care provoacă deces , adesea înainte de vârsta de doi ani. Să presupunem că sunteți consilier genetic și într-o zi intervievați un cuplu fenotipic normal. Soțul a avut un văr primar (din partea tatălui) care a murit din cauza TSD , iar soția a avut un unchi matern cu TSD . Nu există alte cazuri cunoscute în niciuna dintre familii și niciuna dintre căsătorii nu a fost între persoane înrudite. Să presupunem că această trăsătură este foarte rară.

(a) Desenați genealogia familiilor acestui cuplu, arătând persoanele relevante .

(b) Calculați probabilitatea ca atât bărbatul , cât și femeia să fie purtători de TSD.

(c) Care este probabilitatea ca niciunul dintre ei să nu fie purtător?

(d) Care este probabilitatea ca unul dintre ei să fie purtător, iar celălalt *să* nu fie? *[Indiciu:* valori p] [numărul corespunzătoare cazurilor (b), (c) și (d) trebuie să fie egal cu 1.]

29. *Datura stramonium* (stramonium) poate avea flori violete sau albe și texturi ale păstăilor netede sau spinoase . Rezultatul a două încrucișări în care părinții nu erau neapărat de rasă pură a dat aceste rezultate .

alb spinos X alb spinos —* 3/4 alb spinos:

1/4 alb moale violet spinos X violet moale —• 3/4 violet moale: 1/4 alb moale

(a) Pe baza acestor rezultate, formulează o ipoteză privind moștenirea trăsăturilor violet /alb și neted/țepos.

(b) sunt disponibile tulpini de rasă pură cu toate combinațiile de trăsături, ce încrucișare ați putea realiza și extinde la generația F2 - pentru a confirma sau infirma ipoteza ? Presupunând că ipoteza este corectă, ce rezultate ale acelei încrucișări ar confirma-o?

30. Musca de fructe de tip sălbatic (normală) Drosophila melanogaster *are aripi* drepte și peri lungi. Au fost izolate tulpini mutante care au fie aripi curbate , fie peri scurți . Genele responsabile pentru aceste trăsături mutante sunt situate pe cromozomi diferiți. Examinați cu atenție datele pentru cele cinci încrucișări prezentate mai jos .

(a) Stabiliți pentru fiecare mutație dacă este dominantă sau recesivă. În fiecare caz, identificați încrucișările care susțin răspunsul.

(b) Definiți simboluri pentru gene și, pentru fiecare încrucișare, determinați genotipurile părinților.

31. O alternativă la utilizarea ecuației binomiale extinse și a triunghiului lui Pascal pentru a determina probabilitatea fenotipurilor într-o generație ulterioară, atunci când genotipurile părinților sunt cunoscute, este utilizarea următoarei ecuații:

$$\frac{n!}{s!t!}a^s b^t$$

unde M este numărul total de urmași, *s este* numărul de urmași ai unei clase fenotipice , *t* numărul de urmași din cealaltă clasă fenotipică , *a este probabilitatea* apariției primului fenotip, iar *b* este probabilitatea celui de-al doilea fenotip. Folosind această ecuație , determinați probabilitatea ca o familie cu cinci copii să aibă exact doi copii afectați de anemie falciformă (o boală autozomal recesivă) atunci când ambii părinți sunt heterozigoți pentru alela anemiei falciforme .

32. Pentru a testa legea segregării a lui Mendel folosind împerecheri, au fost încrucișate două soiuri de rasă pură, una înaltă (EE) și una pitică (ee). Plantele înalte heterozigote (Ee) au fost încrucișate pentru a produce două grupuri de date F2 , după cum urmează.

Grupa I	Grupa II
30 de înregistrări noi	300 de înregistrări noi
5 pitici	50 de pitici

(a) testul chi- pătrat , analizați rezultatele ambelor seturi de date. Calculați valorile lui *x1* · și estimați valorile lui *p* în ambele cazuri.

(b) Ce se poate concluziona din analiza anterioară cu privire la importanța obținerii unor seturi mari de date în testele experimentale ?

33. După examinarea desenelor lui Sutton ale cromozomilor lăcustei grase *(Brachystola* magna , Eleanor Carothers (1913) , studiind un tip de lăcustă, a observat că există o pereche de cromozomi diferiți - o diadă mare și o diadă mică - care formează o tetradă în fiecare dintre cele 300 de spermatozoizi primari. În plus, la femele a fost identificat un cromozom suplimentar (nepereche și ulterior numit cromozomul X) , astfel încât masculii aveau 23 de cromozomi , iar femelele 24. Carothers a descoperit că diada mai mare din fiecare dintre perechile diferite s-a deplasat spre același pol ca și cromozomul suplimentar în 154 de anafaze, în timp ce diada mai mică a însoțit cromozomul suplimentar în cele 146 de anafaze rămase. (a) Cum se leagă aceste descoperiri de postulatele lui Mendel ? și (b) Cum susțin aceste rezultate teoria cromozomială a moștenirii?

	Número de descendientes			
Cruce	alas rectas, quêtas largas	alas rectas, quêtas cortas	alas curvadas, quêtas largas	alas curvadas, quotas cortas
1. rectas, cortas X rectas, cortas	30	90	10	30
2. rectas, largas X rectas, largas	120	0	40	0
3. curvadas, largas X rectas, cortas	40	40	40	40
4. rectas, cortas X rectas, cortas	40	120	0	0
5. curvadas, cortas X rectas, cortas	20	60	20	60

34. Dentinogeneza *imperfectă,* sau dentina opalescentă ereditară , este o tulburare dentară legată de producerea sialofosfoproteinei dentinei, o componentă asemănătoare osului , care se găsește în stratul mijlociu protector al dinților. Trăsătura este moștenită ca o alelă autosomal dominantă, situată pe cromozomul 4 la om și apare la 1 din 6.000 până la 8.000 de persoane. Să presupunem că un bărbat cu *dentinogeneză imperfectă* - al cărui tată a avut tulburarea, dar a cărui mamă avea dinți normali - se căsătorește cu o femeie cu dinți normali. Cuplul are șase copii. Care este probabilitatea ca primul lor copil să fie un fiu cu *dentinogeneză imperfectă?* Care este probabilitatea ca trei dintre cei șase copii ai lor să aibă tulburarea?

4

Extensii ale geneticii mendeliene, de exemplu

CONCEPTE CAPITOL

„ Deși alelele sunt transmise de la părinți la urmași conform principiilor mendeliene, ele adesea nu prezintă relațiile clare de dominanță/recesiune observate de Mendel.”

►► În multe cazuri, spre deosebire de genetica mendeliană, se știe că două sau mai multe gene influențează fenotipul unei trăsături.

H O altă excepție de la moștenirea mendeliană este prezența genelor pe cromozomii sexuali, astfel încât unul dintre sexe are un singur membru al acestor cromozomi, eliminând posibilitatea heterozigoției.

►► Fenotipurile sunt adesea rezultatul atât al genelor , cât și al mediului în care acestea sunt exprimate.

►► Consecința diferitelor excepții de la principiile mendeliene este existența unor raporturi fenotipice diferite de cele care apar în încrucișările tipice monohibride, dihibride și trihibride.

deja principiile de bază ale geneticii transmiterii . Am văzut că genele

'și se găsesc pe cromozomii omologi și aceștia se separă și se transmit independent.

/ mintea altor cromozomi care se separă în timpul formării gameților. Acestea sunt cele două principii de bază ale transmiterii genelor de la părinți la urmași. Cu toate acestea, atunci când un urmaș primește întregul set de gene, expresia acestor gene este cea care determină fenotipul organismului. Atunci când expresia genelor nu urmează un model dominant/recesiv sau când mai mult de o pereche de gene influențează expresia unei trăsături, raporturile F1 clasice 3:1 și 9:3:3: 1 sunt de obicei modificate. În acest capitol și în capitolele următoare, vom lua în considerare moduri de moștenire mai complexe. Deși există modele de moștenire mai complexe , principiile fundamentale stabilite de Mendel sunt valabile și în aceste situații.

În acest capitol, discuția noastră se va limita inițial la moștenirea trăsăturilor reglate de un singur set de gene. În organismele diploide, unde există perechi de cromozomi omologi, ambele copii ale fiecărei gene influențează astfel de trăsături. Copiile nu trebuie neapărat să fie identice, deoarece **într-o populație există forme alternative de gene, sau alele**. Accentul principal va fi pus pe modul în care alelele interacționează pentru a produce un anumit fenotip. Vom lua apoi în considerare **interacțiunea genelor,** o situație în care un singur fenotip este controlat de mai multe gene. Pentru a ilustra o gamă de modele de moștenire observate în astfel de situații, vor fi prezentate numeroase exemple.

Până acum, ne-am limitat discuția la cromozomii, alții decât perechea X și Y. Examinând cazurile în care genele sunt situate pe cromozomul X, demonstrând **legătura X,** vom vedea și alte modificări ale raporturilor mendeliene. Discuția noastră despre - raporturile modificate se încheie cu o analiză a moștenirii limitate și influențate de sex, care sunt cazuri în care sexul individului, dar nu neapărat cromozomul X, influențează fenotipul. Vom încheia capitolul arătând cum un anumit fenotip variază adesea în funcție de mediul în care se găsește gena, celula sau organismul. Această discuție indică faptul că **expresia fenotipică** depinde de mai mult decât genotipul organismului.

Alelele modifică fenotipurile în moduri diverse

La începutul secolului al XX-lea, după **redescoperirea** operei lui Mendel, cercetarea și-a concentrat atenția **asupra** numeroaselor moduri în care genele pot influența fenotipul unui individ. Cursul urmat de cercetare, înrădăcinat în descoperirile lui Mendel , se numește genetică neo -mendeliană *(neo* din cuvântul grecesc care înseamnă nou).

Fiecare tip de moștenire descris în acest capitol a fost investigat atunci când datele observate nu corespundeau exact rapoartelor mendeliene așteptate . Au fost propuse și testate ipoteze care modificau și extindeau principiile mendeliene folosind încrucișări special concepute. Explicațiile pentru aceste observații au fost construite conform principiului conform căruia un fenotip este controlat de una sau mai multe gene, situate în loci specifici pe una sau mai multe perechi de cromozomi omologi.

Pentru a înțelege diferitele moduri de moștenire, trebuie mai întâi să luăm în considerare funcția potențială a unei **alele.** Alelele sunt diferitele forme alternative ale unei gene. Alela care apare cel mai frecvent într-o populație, cea pe care o desemnăm arbitrar ca fiind normală, se numește alelă *de tip sălbatic.* Această alelă este adesea, deși nu întotdeauna, dominantă. Alelele de tip sălbatic sunt responsabile pentru fenotipul de tip sălbatic corespunzător și sunt utilizate ca standard pentru a compara toate celelalte mutații care apar la un anumit locus.

O alelă mutantă are informații genetice alterate și adesea specifică un produs genetic modificat. De exemplu, în populațiile umane, sunt cunoscute multe alele ale genei care codifică lanțul *fi* al hemoglobinei . Toate aceste alele stochează informații necesare pentru sinteza lanțului polipeptidic *(i),* dar fiecare specifică o formă ușor diferită a aceleiași molecule. Odată sintetizat, produsul unei alele poate sau nu să aibă funcția modificată.

Procesul de mutație este originea alelelor . Pentru ca o nouă alelă să fie recunoscută la observarea unui organism , aceasta trebuie să ducă la o modificare a fenotipului . Un **nou fenotip** apare ca o consecință a unei modificări a activității funcționale a produsului celular specificat de gena respectivă. De obicei, **mutația** duce la o scădere sau pierdere a funcției specifice a **tipului sălbatic** . De exemplu, dacă o genă este responsabilă de sinteza unei anumite enzime, o mutație a genei respective poate schimba în cele din urmă conformația acelei enzime , reducând sau eliminând afinitatea acesteia pentru substrat . O astfel de mutație se numește **mutație cu pierdere de funcție.** Dacă pierderea este completă, mutația are ca rezultat ceea ce se numește o **alelă nulă.**

În schimb, alte mutații pot crește funcția produsului genetic de tip sălbatic. Aproape întotdeauna , acest lucru se întâmplă ca urmare a unei creșteri a cantității produsului genetic . În astfel de cazuri, **mutația** afectează reglarea transcripției genei în cauză. Aceste cazuri sunt numite mutații **de tip „gain-of-function”,** care în mod normal duc la alele dominante , deoarece într-un organism diploid o copie este suficientă

pentru a altera fenotipul normal. Exemple de mutații de tip „gain-of-function" includ conversia genică a proto-oncogenelor, care reglează ciclul celular, în oncogene, care anulează reglarea prin exces de produs genetic. Rezultatul este originea unei celule canceroase. Un alt exemplu ar fi o mutație care modifică sensibilitatea unui receptor, făcând ca un semnal molecular inhibitor să nu poată preveni un răspuns biochimic specific. Într-un fel, acest lucru asigură că funcția produsului genetic este întotdeauna activată. După examinarea mutațiilor de tip „loss-of-function" și „gain-of-function", este important de menționat că o mutație poate duce la o alelă care nu produce nicio modificare detectabilă a funcției. În acest caz, mutația nu ar fi imediat evidentă, deoarece nu ar exista o variație evidentă a fenotipului. Cu toate acestea, o astfel de mutație ar putea fi detectată prin examinarea directă a secvenței de ADN a genei. Aceste mutații sunt uneori numite mutații neutre, deoarece produsul genetic nu produce nicio modificare a fenotipului sau a adaptării evolutive a organismului .

În cele din urmă, rețineți că, deși o trăsătură fenotipică poate fi afectată de o singură mutație într -o singură genă, trăsăturile sunt adesea influențate de mai multe produse genetice. De exemplu, reacțiile enzimatice fac aproape întotdeauna parte din căi metabolice complexe care duc la sinteza unui produs final , cum ar fi un aminoacid. Mutațiile în oricare dintre reacțiile acelei căi pot avea același efect comun: incapacitatea de a sintetiza produsul final . Prin urmare, trăsăturile fenotipice legate de produsul final sunt adesea influențate de mai multe gene. Acesta este cazul, de exemplu, al mutațiilor legate de culoarea ochilor la Drosophila . Culoarea ochilor rezultă din sinteza și depunerea unui pigment maro și a unui pigment roșu aprins pe fațetele ochiului compus. Acest lucru face ca ochii varietății de tip sălbatic să fie roșii -cărămidă . Există mai multe mutații recesive cu pierdere a funcției care perturbă calea în mai multe etape care duce la sinteza pigmentului maro. Deși aceste mutații reprezintă gene situate pe cromozomi diferiți , toate au ca rezultat același fenotip: un ochi roșu aprins a cărui culoare se datorează absenței pigmentului maro. Exemplele includ mutațiile *vermilion, cinabru* și *stacojiu.* care sunt indistinguibile din punct de vedere fenotipic.

În fiecare dintre numeroasele încrucișări discutate în capitolele următoare, sunt implicate doar una sau foarte puține gene. Rețineți că, în fiecare încrucișare, se presupune că toate genele care nu sunt luate în considerare nu au niciun efect asupra tiparelor de moștenire descrise.

4.2

Geneticienii folosesc o mare varietate de simboluri pentru alele

Am învățat deja cum să simbolizăm alelele pentru trăsături mendeliene simple. Folosim litera inițială a numelui trăsăturii recesive, cu literă mică și italic, pentru a indica alela recesivă și aceeași literă cu literă mare pentru a ne referi la alela dominantă. Astfel, pentru *trăsături înalte* și *pitic,* Întrucât *genul „pitic" este* recesiv, „Ochi" reprezintă alelele responsabile pentru aceste trăsături, respectiv. Mendel a folosit, de asemenea , litere mari și mici pentru a simboliza factorii săi.

sistem util pentru discriminarea între trăsăturile sălbatice și cele mutante a fost dezvoltat în studiile genetice ale musculiței de fructe Drosophila *melanogaster* . În acest sistem, se selectează litera inițială sau o combinație de mai multe litere a numelui trăsăturii mutante . Dacă trăsătura este recesivă, se folosesc litere mici ; dacă este dominantă, se folosesc litere mari. Trăsătura de tip sălbatic este indicată de aceleași litere, dar cu un semn plus (+) ca exponent . De exemplu, *abanosul* Este o mutație recesivă care afectează culoarea corpului Drosophilei . Culoarea normală a corpului la tipul sălbatic este gri. Folosind sistemul de mai sus, *abanosul* este indicat de culoarea *e,* în timp ce griul este indicat de e^+ . La locusul corespunzător, poate exista fie alela de tip sălbatic (e^+) , fie alela mutantă (e). Prin urmare, o muscă diploidă poate prezenta unul dintre următoarele trei genotipuri (cele două fenotipuri sunt indicate între paranteze):

*f*f»*	gri homozigot (tip sălbatic)
heterozigot gri g'/e (tip sălbatic)	
e[e	homozigot *abanos* (mutant)

Bara oblică dintre litere este utilizată pentru a indica faptul că cele două simboluri alele se referă la același locus pe doi cromozomi omologi . Dacă am fi luat în considerare o alelă mutantă dominantă față de alela normală de tip sălbatic , cum ar fi aripile *ridate* la *Drosophila,* cele trei genotipuri posibile ar fi *Wr/Wr, Wr/Wr* și Wr / Wr. Cele două genotipuri inițiale exprimă fenotipul mutant al aripilor ridate .

Un avantaj al sistemului anterior este că, dacă este necesar, poate fi abreviat în continuare : alela de tip sălbatic poate fi indicată pur și simplu prin simbolul +. Luând ca exemplu *abanosul* , desemnarea celor trei genotipuri posibile poate fi redusă la:

+/+	gri homozigot (tip sălbatic)
+/ e	heterozigot gri (tip sălbatic)
abanos homozigot *g/g*	(mutant)

O altă variantă este utilizată atunci când nu există dominanță între alele (o situație pe care o vom studia în Secțiunea 4.3). Folosim pur și simplu litere majuscule și exponenți pentru a desemna alele alternative (de exemplu , R1 si R2 , *Lm si* £ , v ? și IB) .

Există multe sisteme diferite de nomenclatură genetică utilizate pentru a identifica genele din diverse organisme. De obicei, simbolul ales reflectă funcția genei sau chiar o anomalie cauzată de o genă mutantă. De exemplu, la drojdie, *cdk* Este abrevierea pentru gena kinazei dependente de ciclină , al cărei produs este implicat în mecanismele de reglare a ciclului celular discutate în Capitolul 2. La bacterii, *leu* se referă la o mutație care perturbă biosinteza aminoacidului leucină, în timp ce gena de tip sălbatic este desemnată *leu'*. Simbolul *dnaA* BRCA1 reprezintă o genă bacteriană implicată în replicarea ADN-ului (iar DnaA, fără caractere italice, se referă la proteina specificată de acea genă). La om, se folosesc majuscule italice pentru denumirea genelor: *BRCA1* Aceasta se referă la una dintre genele asociate cu susceptibilitatea la cancerul de sân . Deși aceste sisteme diferite pot părea complexe, toate sunt modalități utile de a simboliza genele .

Cu dominanță incompletă sau parțială, niciuna dintre alele nu este dominantă.

Spre deosebire de încrucișările mendeliene descrise în Capitolul 3, o încrucișare între părinți cu trăsături alternative poate duce uneori la urmași cu un fenotip intermediar. De exemplu, dacă încrucișăm plante cu flori roșii de genealogie *Patru ora* sau *Snapdragon* cu plante cu flori albe, urmașii vor avea flori roz . Deoarece la planta F1 de culoare intermediară se produce un anumit pigment roșu , nici culoarea roșie, nici cea albă a florilor nu sunt dominante. Această situație este cunoscută sub numele de dominanță incompletă sau parțială.

Dacă fenotipul este sub controlul unei singure gene și a două alele, și niciuna dintre alele nu este dominantă , rezultatele încrucișării F_1 (roz) x F_2 (roz) pot fi prezise . Generația F_2 rezultată , prezentată în Figura 4.1, confirmă ipoteza că există o singură pereche de alele care determină aceste fenotipuri. Raportul genotipic (1:2:1) al generației F_2 este identic cu cel al încrucișării monohibride a lui Mendel . Cu toate acestea, deoarece niciuna dintre alele nu este dominantă , raportul fenotipic este identic cu raportul genotipic (spre deosebire de raportul fenotipic 3:1 al unei încrucișări mendeliene monohibride). Rețineți că, deoarece niciuna dintre alele nu este

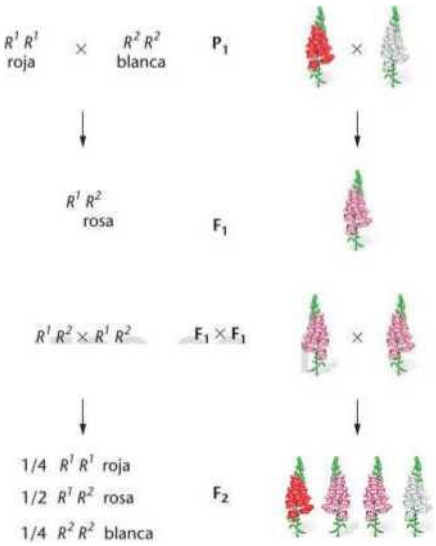


FIGURA 4.1 Dominanță incompletă ilustrată de culoarea florii plantei de gura-leului.

Deoarece este recesiv, nu am ales litere mari și mici ca simboluri. În schimb, am desemnat alelele roșii și albe folosind R1 și R2 · Am fi putut alege IV1 · și IV² sau orice altă denumire, cum ar fi Cw și *C″*, unde C indică culoarea, iar superscriptele W și R indică alb, respectiv roșu.

Cum interpretăm lipsa de dominanță atunci când heterozigoții prezintă un fenotip intermediar ? Cea mai precisă abordare este de a considera expresia genelor cantitativ. În exemplul anterior de culoare a florii, mutația care are ca rezultat flori albe este foarte probabil o mutație completă de „pierdere a funcției”. În acest caz, produsul genetic al alelei de tip sălbatic (R1) este probabil o enzimă implicată în reacția care sintetizează pigmentul roșu. Alela mutantă (R2) ar

produce o enzimă incapabilă să catizeze reacția care produce pigmentul. Rezultatul final este că heterozigotul produce doar aproximativ jumătate din pigmentul plantelor cu flori roșii, rezultând un fenotip roz.

Cazurile bine definite de dominanță incompletă sunt relativ rare. Cu toate acestea, chiar și atunci când o alelă pare să aibă o dominanță completă asupra celeilalte, examinarea atentă a produsului genetic, mai degrabă decât a fenotipului, relevă adesea un nivel intermediar de expresie genică. Un exemplu ar fi boala Tay-Sachs, tulburarea biochimică umană , în care indivizii recesivi homozigoți sunt grav afectați de o anomalie fatală în depozitarea lipidelor , astfel încât nou-născuții mor între primul și al treilea an de viață. Reamintim explicațiile despre această boală umană (Capitolul 3, pagina 60). La indivizii afectați, nu există aproape nicio activitate a enzimei hexosainidaze A, care este în mod normal implicată în metabolismul lipidelor. Heterozigoții, care posedă o singură copie a genei mutante, sunt fenotipic normali, dar prezintă doar 50% din activitatea enzimatică în comparație cu indivizii homozigoți normali. Din fericire, acest nivel de activitate - enzimatică este suficient pentru a atinge o funcție biochimică normală. Această situație nu este neobișnuită în anomaliile enzimatice și ilustrează conceptul de efect de prag, prin care expresia fenotipică normală apare ori de câte ori este atins un anumit nivel al produsului genetic. Foarte des , și în special în boala Tay-Sachs , pragul este sub 50%.

4.4

În codominanță, influența ambelor alele la heterozigoți este foarte evidentă.

Dacă două alele ale unei singure gene sunt responsabile pentru producerea a doi produși genetici diferiți și detectabili, apare o situație care diferă de dominanța incompletă sau de dominanță/recesivitate. Într - un astfel de caz, coexprimarea - ambelor alele la individul heterozigot se numește codominanță. Grupa sanguină MN la om ilustrează acest fenomen. Karl Landsteiner și Philip Levine au descoperit o moleculă de glicoproteină găsită pe suprafața globulelor roșii care acționează ca un antigen înnăscut, oferind identitate biochimică și imunologică indivizilor. În populațiile umane, există două forme ale acestei glicoproteine, desemnate M și N. Un individ poate poseda una sau ambele.

Sistemul MN este controlat de un locus autosomal situat pe cromozomul 4, iar cele două alele ale sale sunt numite *L, M* și L. Deoarece oamenii sunt diploizi, sunt posibile trei combinații, fiecare rezultând într-o grupă sanguină diferită:

Genotip	Fenotip
• *M, M*	M.
L M L N	Minnesota
L N L N	N

Conform predicțiilor, încrucișarea dintre doi părinți - heterozigoți MN poate produce urmași cu toate cele trei grupe sanguine , așa cum se arată mai jos :

L U L" X *L U LN*

Yo

1/4 L „t"

1/2 *L"*

1/4 *L N L N*

Din nou, raportul genotipic 1:2:1 este menținut.

Moștenirea codominantă este caracterizată prin *exprimarea* - diferențiată a *produselor genetice ale ambelor alele.* Această caracteristică distinge codominanța de dominanța incompletă , în care indivizii heterozigoți exprimă un fenotip intermediar sau mixt. Pentru ca codominanța să fie studiată, ambele produse genetice - trebuie să fie detectabile fenotipic. Vom vedea un alt exemplu de codominanță atunci când vom examina grupa sanguină ABO.

O populație poate conține gene cu mai multe alele

Întrucât o cantitate mare de informații este stocată în orice genă , mutațiile o pot modifica în multe moduri. Fiecare modificare are potențialul de a da naștere unei alele diferite . Prin urmare , pentru orice genă, numărul de alele prezente la indivizii unei populații nu este neapărat limitat la două. Atunci când se găsesc trei sau mai multe alele pentru aceeași genă , se spune că există alele multiple, ceea ce dau naștere unui mod caracteristic de moștenire. Este important să se înțeleagă că *alele multiple pot fi studiate doar în populații.* Orice individ al unui organism diploid are, cel mult, două loci genetice omoloage, care pot fi ocupate de alele diferite ale aceleiași gene. Cu toate acestea, la membrii unei specii, pot exista multe forme alternative ale aceleiași gene.

Grupa sanguină ABO

Cel mai simplu caz de alele multiple este atunci când există trei alele alternative ale unei gene. Acest lucru se întâmplă

în moștenirea grupei sanguine ABO la om, descoperită la începutul secolului al XX-lea de Karl Landsteiner. Sistemul ABO, la fel ca grupa sanguină MN, este caracterizat prin prezența antigenelor pe suprafața globulelor roșii. Cu toate acestea, antigenele A și B sunt distincte de antigenele MN și sunt controlate de o genă diferită, situată pe cromozomul 9. Ca și în sistemul MN, o combinație de alele ABO prezintă moștenire codominanta.

Fenotipul ABO al unui individ este determinat prin amestecarea unei probe de sânge cu un antiser care conține anticorpi A sau B. Dacă antigenul este prezent pe suprafața globulelor roșii ale acelei persoane, acesta va reacționa cu anticorpul corespunzător, provocând coagularea sau aglutinarea globulelor roșii. Când un individ este testat în acest mod, poate apărea unul dintre cele patru fenotipuri. Fiecare individ are fie antigenul A (fenotipul A), antigenul B (fenotipul B), ambele antigene A și B (fenotipul AB), fie niciuna (fenotipul O).

În 1924, s-a propus că moștenirea acestor fenotipuri depinde de trei alele ale aceleiași gene. Această ipoteză s-a bazat pe studii ale grupelor sanguine ale multor familii diferite. Deși se pot utiliza diverse notații, vom folosi simbolurile iA , *I și ei* pentru cele trei alele. Litera / se referă la *izoaglulinogen,* un alt termen pentru antigen. Dacă presupunem că alelele *I, A SI ef* sunt responsabile pentru producerea antigenelor A și respectiv B și că i este o alelă care nu produce niciun antigen A sau B detectabil, putem enumera diferitele genotipuri posibile și fenotipurile lor corespunzătoare:

Genotip	Antigen	Fenotip
r'r*	CĂTRE	
Eu SUNT UN ;	I Δ⌇	LA
fl"	B1	
i>i	BJ	B.
Eu SUNT eu sunt	A, B	AB
al doilea	Nici unul	0

Vă rugăm să rețineți în acest tabel că aripile / și [8] sunt dominante față de aripă, dar co-dominante una în cadrul celeilalte.

Antigenele A și B

Bazele biochimice ale sistemului de grupe sanguine ABO au fost studiate cu atenție. În realitate, antigenele A și B sunt grupări carbohidrați (zahăr) atașate de lipide (acizi grași) care ies din membrana globulelor roșii. Specificitatea antigenelor A și B se bazează pe zahărul terminal al grupării carbohidrate.

Aproape toți indivizii posedă ceea ce se numește substanța H, la care se adaugă unul sau două zaharuri terminale . După cum se arată în Figura 4.2, substanța H conține trei molecule de zahăr - galactoză (Gal), N-acetilglucozamină (AcGluNH) și fucoză - legate chimic între ele . Alela *IA ESTE* responsabilă pentru o enzimă care poate adăuga zahărul terminal N-acetilgalactozamină (AcGalNH) la substanța H. Alela Ib *este responsabilă* pentru o enzimă modificată care nu poate adăuga N -acetilgalactozamină , ci poate adăuga în schimb o galactoză terminală. Persoanele heterozigote *(1*1*)* adaugă unul sau altul dintre aceste zaharuri la numeroasele situsuri disponibile (substraturi) de pe suprafața globulelor roșii , explicând astfel baza biochimică a codominanței la indivizii cu grupa sanguină AB . În cele din urmă, indivizii cu grupa sanguină O (ü) nu pot adăuga niciunul dintre aceste zaharuri terminale; aceste persoane au doar substanța H care iese din suprafața globulelor roșii .

Baza genetică moleculară a mutațiilor care dau naștere alelelor *IA · IB* și *'A* fost , de asemenea, clarificată . O vom descrie în Capitolul 16, când vom discuta despre mutație și mutageneză .

Fenotipul Bombay

În 1952, a fost observată o situație foarte rară care a oferit informații despre baza genetică a substanței H. O femeie din Bombay a prezentat un istoric genetic unic, care nu corespundea grupei sale sanguine . Când a necesitat o transfuzie de sânge , s -a constatat că nu avea antigenele A și B și, prin urmare , a fost de tip 0. Cu toate acestea , așa cum se arată în pedigree -ul parțial din Figura 4.3 , unul dintre părinții ei avea grupa sanguină AB , iar ea a fost donatorul evident al alelei *I B.* la doi dintre copiii săi. Prin urmare, genetic era B, dar funcțional O!

Ulterior s -a demonstrat că această femeie era homozigotă pentru o mutație recesivă rară a *unei* gene numite FUTI. (care codifică o enzimă fucoziltransferază), împiedicând -o să sintetizeze substanța H completă . În această mutație, porțiunea terminală a lanțului carbohidrat care iese din membrana globulelor roșii nu conține fucoză , care este în mod normal adăugată de enzimă . În absența fucozei , enzimele specificate de alelele *I LA ...* B *-ul* Se pare că aceștia nu sunt capabili să recunoască substanța incompletă H ca substrat adecvat. Prin urmare , nici galactoza terminală , nici N-acetilgalactozamina nu pot fi adăugate, chiar și atunci când enzimele capabile să facă acest lucru sunt prezente și funcționale. Prin urmare , genotipurile grupei sanguine ABO nu pot fi exprimate la indivizii homozigoți pentru forma mutantă a genei *FUTI* . Deși pot avea alelele *IA SI* /sau Z8 , niciunul dintre antigene [nu] este adăugat la suprafața celulei și sunt

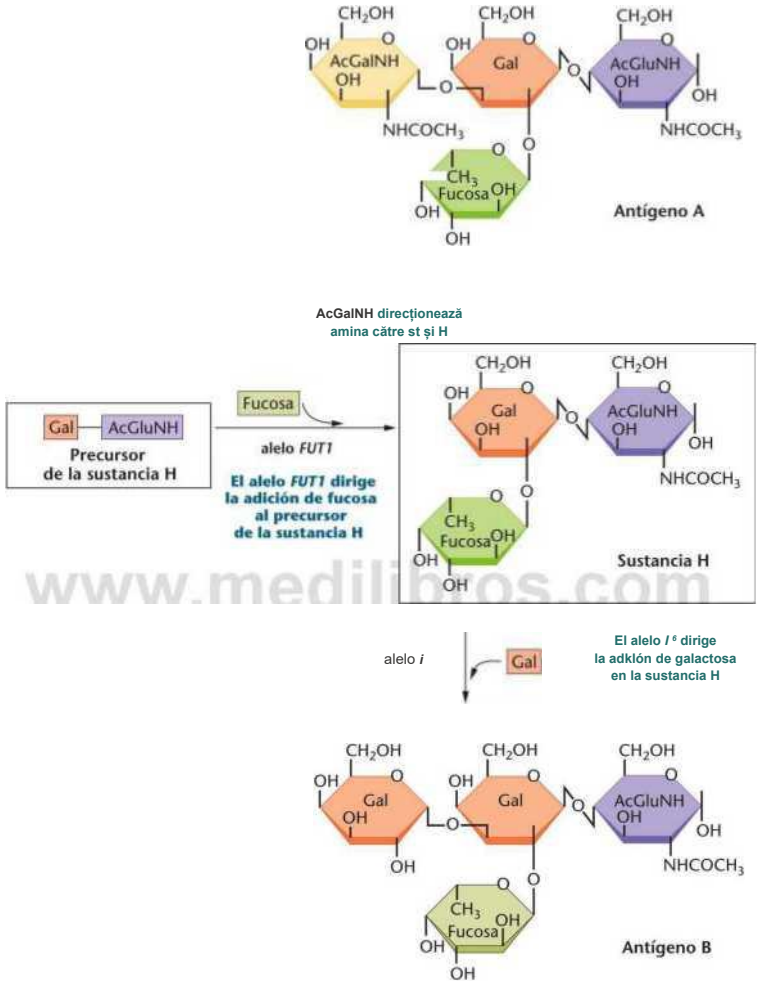


FIGURA 4.2 Baza biochimică a grupei sanguine ABO. Alela de tip sălbatic *FUTI !* Prezentă la aproape toți indivizii, aceasta direcționează conversia unei molecule precursoare în substanța H prin adăugarea unei molecule de fosfoză. Alelele *f* și *f* pot apoi direcționa adăugarea de reziduuri terminale de zahăr la substanța H. Alela J este incapabilă să efectueze aceste adăugiri terminale. Incapacitatea de a produce substanța H are ca rezultat fenotipul Bombay, în care indivizii sunt de tip O ,, indiferent de prezența alelelor f · Gal: galactoză; AcCluNH: N-acetilglucozamină; AcGalNH: N - acetilgalactoză.

funcțional de tip O. Pentru a-i distinge de restul populației, se spune că au **fenotipul Bombay.** Frecvența alelei FUTI este extrem de scăzută. Prin urmare, marea majoritate a populației umane poate - sintetiza substanța H.

Locusul alb al *lui* Drosophr/a

Există multe alte fenotipuri la plante și animale care sunt influențate de moștenirea alelică multiplă. La Drosophila ii-Jti ₆, există multe alele la aproape fiecare locus. Mutația

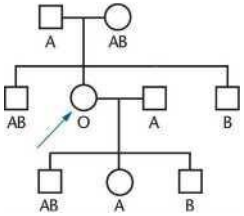


FIGURA 4.3 Pedigree parțial al unei femei cu fenotipul Bombay. Funcțional, grupa ei sanguină ABO se comportă ca grupa sanguină O. Genetic, este de tip B.

Alela recesivă care provoacă ochii albi, descoperită de Thomas H. Morgan și Calvin Bridges în 1912, este una dintre cele peste 100 de alele care pot ocupa acest locus. În această serie alelică, culorile ochilor variază de la absența completă a pigmentului, în alela *albă,* până la o culoare rubinie intensă, în *alela alb-satsuma,* trecând prin portocaliu în alela alb-caisă *și bej* în *alela alb-bej.* Aceste alele sunt desemnate ν, με, κα , $^{\mu\epsilon\iota}$, $\kappa^{\cdots}$ și $w'^{\backslash}$ respectiv. În fiecare caz, cantitatea totală de pigment din acești ochi mutanți este redusă la mai puțin de 20% din cea găsită în ochiul de tip sălbatic roșu-cărămiziu. Tabelul 4.1 enumeră aceste alele și alte *alele albe,* împreună cu fenotipurile lor de culoare.

TABELUL 4.1

Unele dintre alelele prezente la *locusul alb al* *Drosophila*

Alele	Nume	Culoarea ochilor
V	*alb*	alb pur
*w**	*caisă albă*	portocaliu gălbui
w^{w}	*alb-gălbui*	clar
w»	*sânge alb*	rubin gălbui
m^{d}	*cafea albă*	rubin intens
noi	eozină albă	roz gălbui
H'm ˚	*portocaliu alb-pătat satsuma albă*	portocaliu deschis pătat rubin intens
w^{v}	*pete albe*	granulație fină, galben pătat
ce	*cu nuanțe albe*	roz deschis

Este interesant de examinat baza biologică a mutației *albe* originale la *Drosophila.* Având în vedere ceea ce știm despre culoarea ochilor la acest organism, ar putea părea logic să presupunem că alela mutantă perturbă cumva sinteza biochimică a pigmenților responsabili de ochii roșu-cărămiziu ai musculiței de tip sălbatic. Cu toate acestea, este acum clar că produsul locusului *alb este* o proteină implicată în transportul pigmenților către omatidii (unitățile individuale) care alcătuiesc ochiul compus. Deși musculițele care prezintă mutația *albă* pot sintetiza în mod normal pigmenții oculari, nu îi pot transporta către aceste unități structurale ale ochiului, rezultând astfel fenotipul alb.

Alelele letale sunt gene esențiale

Nenumărate produse genetice sunt esențiale pentru supraviețuirea unui organism . Mutațiile cu pierdere de funcție care duc la sinteza unui produs genetic nefuncțional pot fi uneori tolerate la heterozigoți. În astfel de cazuri, o alelă de tip sălbatic poate produce o cantitate suficientă din produsul esențial pentru a permite organismului să supraviețuiască. Cu toate acestea, o astfel de mutație se comportă ca o alelă letală recesivă , iar indivizii homozigoți recesivi nu vor supraviețui. Momentul morții depinde de momentul în care este necesar produsul esențial. La mamifere , de exemplu, acest lucru s-ar putea întâmpla în timpul dezvoltării, la începutul copilăriei sau chiar la vârsta adultă .

ACUM REZOLVĂ ASTA

4.1 La cobai, un locus care determină culoarea blănii poate fi ocupat de oricare dintre următoarele patru alele: C (normal), ? (sepia), / (crem) sau (albinos), cu următoarea ordine de dominanță: C > *o'* > > *e**. (C domină toate celelalte, ? domină ac^y/, dar nu C etc.) În următoarele încrucișări, determinați genotipurile parentale și prezicerți raporturile fenotipice rezultate:

(a) sepia X , unde ambii cobai aveau un părinte albino.

(b) sepia X cream, unde cobaiul sepia avea un părinte albino, iar cobaiul crem avea doi părinți sepia .

(c) sepia X cream, unde cobaiul sepia avea doi părinți de culoare normală , iar cobaiul crem avea doi părinți sepia.

(d) sepia X cream, unde cobaiul sepia avea un părinte de culoare normală și un părinte albino, iar cobaiul crem avea doi părinți de culoare normală.

SUGESTIE: *Această problemă necesită înțelegerea fenomenului alelelor multiple. Cheia rezolvării acesteia constă în acordarea unei atenții deosebite ierarhiei de dominanță a diferitelor alele. Rețineți, de asemenea,* ***că*** *, deși pot exista mai mult de două alele într-o populație, fiecare individ poate avea maximum două. Prin urmare, distribuția alelică între gameți urmează principiul* **segregării** .

În unele cazuri, alela responsabilă de un efect letal în homozigoție poate da naștere unui fenotip mutant caracteristic în heterozigoție. O *astfel de alelă* ***se comportă*** *ca o alelă letală - recesivă , dar este dominantă în raport cu fenotipul.* De exemplu, la începutul secolului al XX-lea , a fost descoperită o mutație care are ca rezultat blana galbenă la șoareci. Figura 4.4 prezintă diferența dintre blana galbenă și blana cu fenotip normal .

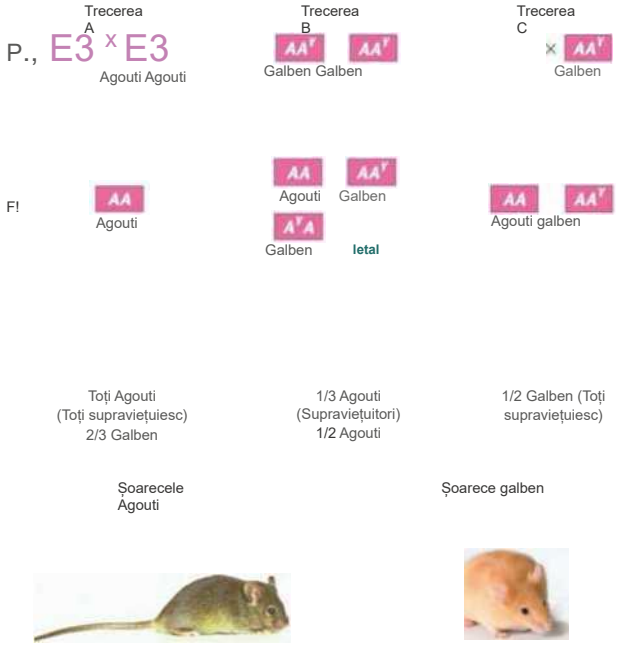


FIGURA 4.4 Modele de moștenire încrucișată triplă care implică alela de tip sălbatic agouti *(A)* și Alela mutantă *galbenă (A)* la șoarece. Rețineți că alela mutantă se comportă ca dominantă față de alela normală în controlul culorii blănii, dar se comportă și ca o alelă leul recesivă în homozigoție. Șoarecii cu genotipul *A ¥ A ᵛ* nu supraviețuiesc.

agouti (tip sălbatic). Încrucișările între diferite combinații ale celor două tulpini au dus la rezultate neobișnuite:

Cruci				
agouti (B) galben	X X	agouti galben	—>	toate agouti
agouti	X	galben	—*	2/3 galben: 1/3 agouti 1/2 galben: 1/2 agouti

Aceste rezultate sunt explicate prin luarea în considerare a unei singure perechi de alele. În ceea ce privește culoarea blănii, alela mutantă galbenă *(Á ¹)* Este dominantă față de *alela agouti de tip sălbatic (A),* deci șoarecii heterozigoți vor avea blană galbenă. Cu toate acestea, alela *galbenă* se comportă și ca un factor letal recesiv în homozigoție. Când sunt prezente două copii, șoarecii mor înainte de naștere. Prin urmare, nu există șoareci galbeni homozigoți. Baza genetică a acestor trei încrucișări este prezentată în Figura 4.4.

În alte cazuri, o mutație se poate comporta ca o alelă letală dominantă. Când se întâmplă acest lucru, prezența unei singure copii a alelei provoacă moartea individului. La om, o boală numită boala Huntington este cauzată de o alelă autosomal dominantă H, debutul bolii fiind întârziat la indivizii heterozigoți *(Hh).* până la vârsta adultă . Persoanele afectate suferă apoi de degenerare treptată a nervilor și motorii până la moarte. Această boală fatală este deosebit de tragică din cauza debutului său tardiv, de obicei în jurul vârstei de 40 de ani. Până atunci, persoana afectată ar fi putut întemeia o familie, iar fiecare dintre copiii săi are o șansă de 50% de a moșteni alela letală , de a o transmite urmașilor săi și, în cele din urmă, de a dezvolta boala. Cântărețul și compozitorul folk Woody Guthrie (tatăl actualului cântăreț folk Arlo Guthrie) a murit din cauza acestei boli la vârsta de 39 de ani .

Alelele letale dominante sunt foarte rare. Pentru a le găsi într -o populație, indivizii afectați trebuie să se reproducă înainte ca alela letală să fie exprimată, așa cum se poate întâmpla în cazul bolii Huntington . Dacă toți indivizii afectați mor înainte de a atinge vârsta reproductivă , alela mutantă nu va fi transmisă generațiilor

ulterioare și va dispărea din populație, cu excepția cazului în care reapare ca urmare a unei noi mutații .

Kfti

Combinațiile a două perechi de gene implicate în două moduri de moștenire modifică raportul 9:3:3:1

Fiecare dintre exemplele discutate până acum modifică raportul mendelian monohibrid de 3:1 în generația F2 . Prin urmare, combinarea oricăruia dintre aceste modele de moștenire într-o încrucișare dihibridă va modifica, de asemenea, raportul clasic de 9:3:3:1. După ce am stabilit fundamentele modelelor de moștenire ale dominanței incomplete, codominanței, alelelor multiple și alelelor letale, putem aborda acum situația în care două modele de moștenire apar simultan. Principiul mendelian al segregației independente se aplică acestor situații, cu condiția ca genele care controlează fiecare trăsătură să nu fie legate pe același cromozom - cu alte cuvinte, să nu prezinte ceea ce se numește *legătură genetică.*

De exemplu, să presupunem că are loc o încrucișare între un bărbat și o femeie, ambii heterozigoți pentru gena autozomal recesivă responsabilă de albinism și ambii având grupa sanguină AB. Care este probabilitatea ca orice combinație fenotipică specifică să apară la fiecare dintre copiii lor? Albinismul este moștenit într-o manieră mendeliană simplă, în timp ce grupele sanguine sunt determinate de o serie de trei alele multiple: i4, iB și ^{i}. *Soluția* ^{la} *această* problemă este prezentată în Figura 4.5, folosind metoda diagramei de ramificare. Această încrucișare dihibridă nu produce patru fenotipuri în raportul clasic 9:3:3:1. În schimb, apar șase fenotipuri în raportul 3:6:3:1:2:1, ceea ce indică probabilitatea așteptată pentru fiecare fenotip. Aceasta este pur și simplu una dintre numeroasele variante cu rapoarte modificate care rezultă din combinarea diferitelor moduri de moștenire.

Adesea, fenotipurile sunt afectate de mai mult de o genă.

Foarte curând după redescoperirea lucrărilor lui Mendel , datele experimentale au relevat că, în multe cazuri, un anumit fenotip este afectat de mai multe gene. Aceasta a fost o descoperire importantă, deoarece a relevat faptul că influența genelor asupra fenotipului este mult mai complexă decât ceea ce a descoperit Mendel în încrucișările sale cu mazăre de grădină . În loc ca o singură genă să controleze dezvoltarea unor părți specifice ale animalului sau plantei, a devenit curând clar că caracteristicile fenotipice , cum ar fi culoarea ochilor , culoarea părului sau forma fructului, sunt influențate de multe gene diferite și de produsele lor corespunzătoare.

Termenul de interacțiune genetică este adesea folosit pentru a descrie ideea că mai multe gene influențează o anumită trăsătură. Totuși , aceasta nu înseamnă că două sau mai multe gene, sau produsele lor , interacționează neapărat direct pentru a produce un fenotip specific . Mai degrabă , funcția celulară a numeroase produse genetice contribuie la dezvoltarea unui fenotip comun. De exemplu, dezvoltarea unui organ precum ochiul unei insecte este extraordinar de complexă și are ca rezultat o structură cu manifestări fenotipice multiple , cum ar fi un ochi cu o formă, dimensiune, textură și culoare specifice . Dezvoltarea ochiului este o cascadă complexă de evenimente de dezvoltare care duc la formarea acelui organ. Acest proces ilustrează conceptul epigenetic de dezvoltare, unde

Baza moleculară a dominanței și recesivității: gena *agouti*

El análisis molecular del gen responsable de la existencia de ratones de color agutí y amarillo ha proporcionado datos sobre cómo una mutación puede ser a la vez dominantă pentru un efect fenotipic (culoarea blănii) și recesivă pentru altul (dezvoltarea embrionară). Alela $A^{Y\ ESTE}$ un exemplu clasic de mutație cu câștig de funcție. Animalele homozigote pentru alela *A* de tip sălbatic au pigmentul galben depus ca o bandă în firele de păr negre, rezultând fenotipul agouti *(vezi* Figura 4.4). Indivizii heterozigoți depun pigmentul galben pe întreaga lungime a părului datorită ștergerii regiunii de reglare care precede regiunea care codifică alela *AY* în ADN . Fără capacitatea de a regla expresia genelor , o copie a ^{ALELEI} *AY* este întotdeauna activată la indivizii heterozigoți , rezultând *câștigul* de funcție care produce efectul dominant .

Efectul letal în homozigoție a fost explicat și prin analiza moleculară a genei mutante. Deleția mare a materialului genetic care dă naștere alelei A v duce la extinderea acesteia în regiunea codificatoare a unei gene adiacente *(Mere)* . făcând-o nefuncțională . Această genă este esențială pentru dezvoltarea embrionară , iar pierderea funcției sale la indivizii homozigoți A și /A ^{z} este ceea ce duce la letalitate . Indivizii heterozigoți depășesc pragul necesar pentru produsul genei Mere de tip sălbatic și, prin urmare, supraviețuiesc.

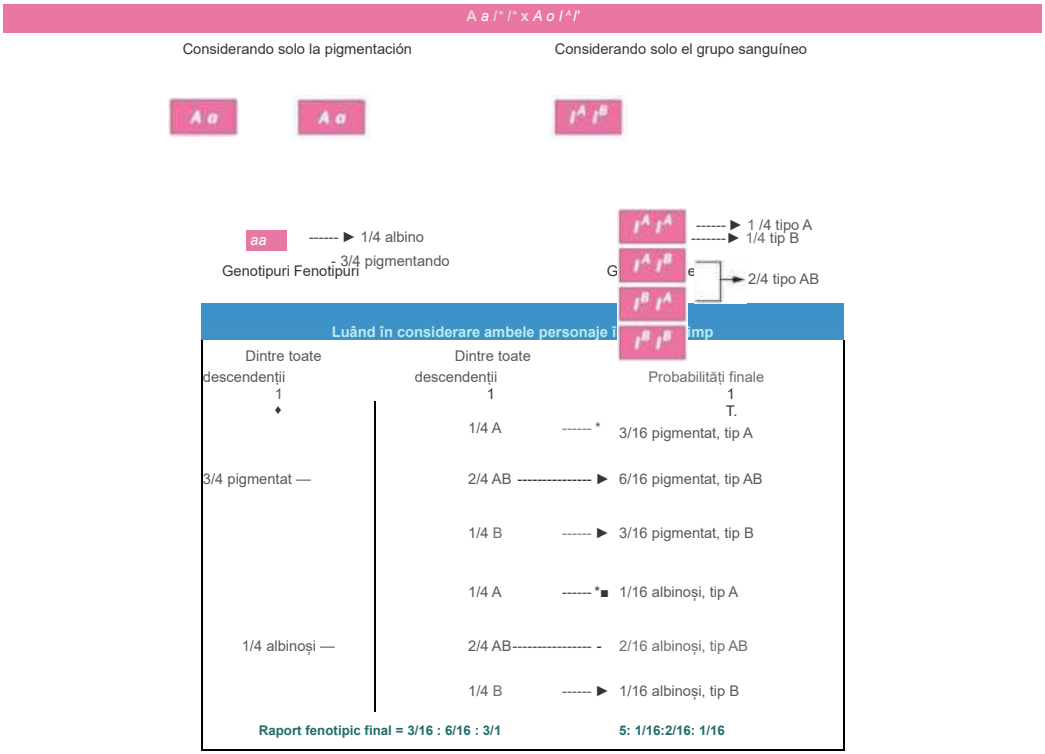

A a I^A I^B x A a I^A I^B
Considerando solo la pigmentación
Considerando solo el grupo sanguíneo
A a
A a
I^A I^B
aa
------ ► 1/4 albino
- 3/4 pigmentando
Genotipuri Fenotipuri
I^A I^A
I^A I^B
I^B I^A
I^B I^B
------ ► 1 /4 tipo A
------ ► 1/4 tip B
2/4 tipo AB
Luând în considerare ambele personaje
Dintre toate descendenții 1
Dintre toate descendenții 1
Probabilități finale 1
T.
1/4 A ------ * 3/16 pigmentat, tip A
3/4 pigmentat —
2/4 AB ----------► 6/16 pigmentat, tip AB
1/4 B ------ ► 3/16 pigmentat, tip B
1/4 A ------ *■ 1/16 albinoși, tip A
1/4 albinoși —
2/4 AB---------- - 2/16 albinoși, tip AB
1/4 B ------ ► 1/16 albinoși, tip B
Raport fenotipic final = 3/16 : 6/16 : 3/1
5: 1/16:2/16: 1/16

FIGURA 4.S Calculul probabilității într-o încrucișare care implică grupa sanguină ABO și albinism la specia umană. Calculul se efectuează folosind metoda diagramei de ramificare .

Fiecare etapă succesivă de dezvoltare crește complexitatea organului sau a caracteristicii pe care o studiem și se află sub controlul și influența multor gene.

Un exemplu foarte ilustrativ de epigeneză și interacțiune dintre mai multe gene este cel al formării urechii interne la mamifere, care permite organismelor să detecteze și să interpreteze sunetele. Structura și funcția urechii interne sunt extrem de complexe. Formarea sa include nu numai caracteristici anatomice distinctive pentru captarea, conducerea și transmiterea sunetelor externe către și prin urechea medie, ci și pentru convertirea undelor sonore în impulsuri nervoase în interiorul urechii interne. Astfel, urechea se formează ca urmare a unei cascade de evenimente de dezvoltare incrementale influențate de multe gene diferite. Mutațiile care perturbă multe dintre etapele dezvoltării urechii duc la un fenotip comun: surditatea ereditară. Într -un fel, aceste gene multiple „interacționează" pentru a da naștere unui fenotip comun. În astfel de situații, fenotipul mutant este numit trăsătură eterogenă pentru a reflecta multiplele gene implicate. La oameni , deși există câteva alele comune care sunt responsabile pentru marea majoritate a cazurilor de surditate ereditară, există peste 50 de gene implicate în dezvoltarea capacității de a detecta sunete .

Epistază

Unele dintre cele mai bune exemple de interacțiune genică sunt cele care prezintă epistază , în care expresia unei perechi de gene maschează sau modifică

efectul altei perechi. Uneori, genele influențează aceeași trăsătură fenotipică generală în mod antagonic, ducând la mascare. Cu toate acestea, în alte cazuri, genele implicate își exercită influența reciprocă într-un mod complementar sau cooperativ.

De exemplu, prezența homozigotă a unei alele recesive poate preveni sau suprima exprimarea altor alele situate la un al doilea locus (sau la alte câteva loci). În acest caz, alelele de la primul locus se consideră a fi *epistatice* față de cele de la al doilea locus, în timp ce alelele de la al doilea locus sunt *hipostatice* față de cele de la primul locus. După cum vom vedea, există diferite variații ale acestei situații. Într-un alt exemplu, o singură alelă dominantă la primul locus poate fi epistatică față de exprimarea alelelor situate la un al doilea locus genetic. Într-un al treilea exemplu, două perechi de gene se pot *completa reciproc* în așa fel încât cel puțin o alelă dominantă la fiecare pereche este necesară pentru a exprima un anumit fenotip.

Fenotipul Bombay pe care l-am discutat anterior este un exemplu de condiție recesivă homozigotă în care un locus maschează expresia unui al doilea locus. În acest caz, am stabilit că prezența homozigotă a formei mutante a genei *FUTI maschează expresia alelelor Ia și Ia.* DOAR INDIVIZII cu cel PUȚIN o alelă

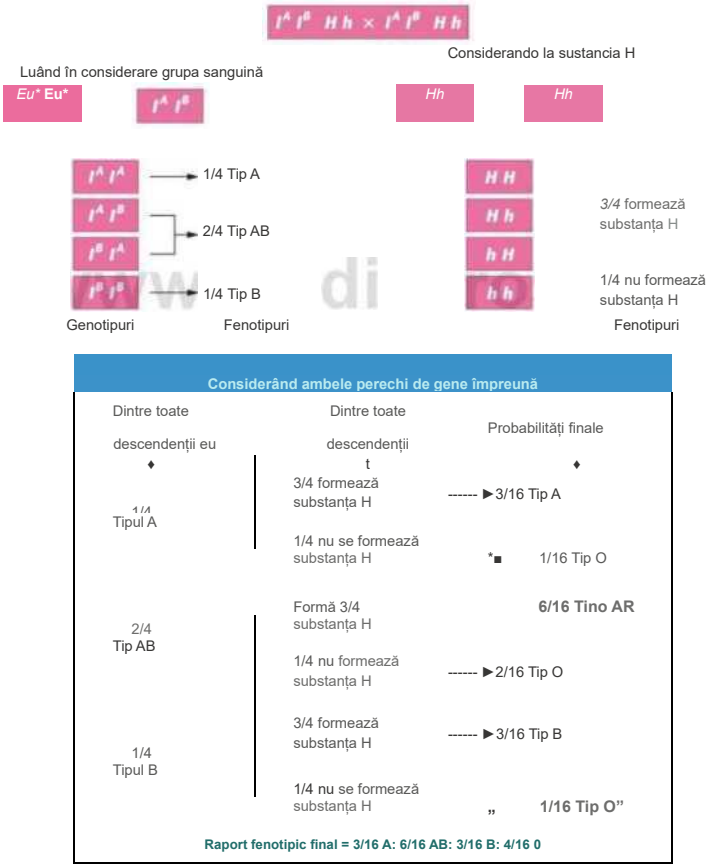


FIGURA 4.6 Rezultatul încrucișării între indivizi heterozigoți pentru două gene care determină grupa sanguină ABO a fiecărui individ. Fenotipurile finale sunt calculate prin luarea în considerare a ambelor gene separat *și* apoi combinarea rezultatelor folosind metoda diagramei de ramificare.

Alelele FUTI de tip sălbatic pot produce fie antigenele A , fie antigenele B. Prin urmare, indivizii ale căror genotipuri includ alelele o *i" și cărora le lipsește alela FUTI* de tip sălbatic au fenotipul O, indiferent de capacitatea lor de a produce ambele antigene. Figura 4.6 prezintă un exemplu al rezultatului unei încrucișări între indivizi heterozigoți pentru ambele loci. Dacă mulți dintre acești indivizi au urmași, raportul fenotipic așteptat la urmași va fi 3 A:6 AB:3 B:4 O.

Este important de reținut două lucruri atunci când examinăm această încrucișare și rapoartele fenotipice așteptate:

1. În această încrucișare, există o distincție importantă în - comparație cu încrucișarea dihibridă modificată din Figura 4.5: *apare o singură trăsătură* - grupa *sanguină* . În încrucișarea dihibridă modificată din Figura 4.5 , grupa sanguină *și* pigmentarea pielii apar ca trăsături fenotipice distincte .
2. Chiar și atunci când apare o singură trăsătură, raporturile fenotipice sunt exprimate în șaisprezecimi. Dacă nu am ști nimic despre substanța H și gena care o controlează, am fi siguri că există o a doua pereche de gene implicată în exprimarea fenotipică, distinctă de cea care controlează antigenii A și B. *Atunci când, în studierea unei trăsături, apare un raport exprimat în șaisprezecimi (de exemplu, 3:6:3:4), acest lucru sugerează că există două perechi de gene care interacționează în exprimarea fenotipului în cauză.*

Studiul interacțiunii genelor a relevat o serie de modele de moștenire care modifică raportul mendelian tipic F2 (9:3:3:1). În mai multe dintre exemplele următoare, epistaza are efectul de a combina una sau mai multe dintre cele patru clase fenotipice în diverse moduri. Figura 4.7 analizează generarea acestor patru grupuri, împreună cu câteva rapoarte modificate.

Pe măsură ce discutăm aceste exemple și altele *(vezi* Figura 4.8), vom face câteva presupuneri și vom adopta anumite convenții, cum ar fi următoarele :

1. În fiecare caz, se produc clase fenotipice distincte , fiecare perfect discernabilă de celelalte. Astfel de caractere ilustrează variația discontinuă, în care categoriile fenotipice sunt discrete și calitativ diferite unele de altele.
2. Genele luate în considerare în fiecare încrucișare sunt situate pe cromozomi diferiți și, prin urmare, sunt transmise - independent una de cealaltă în timpul formării gameților. Pentru a facilita compararea rezultatelor diferitelor încrucișări, vom desemna alelele ca *A, a* și *Bb* în fiecare caz.

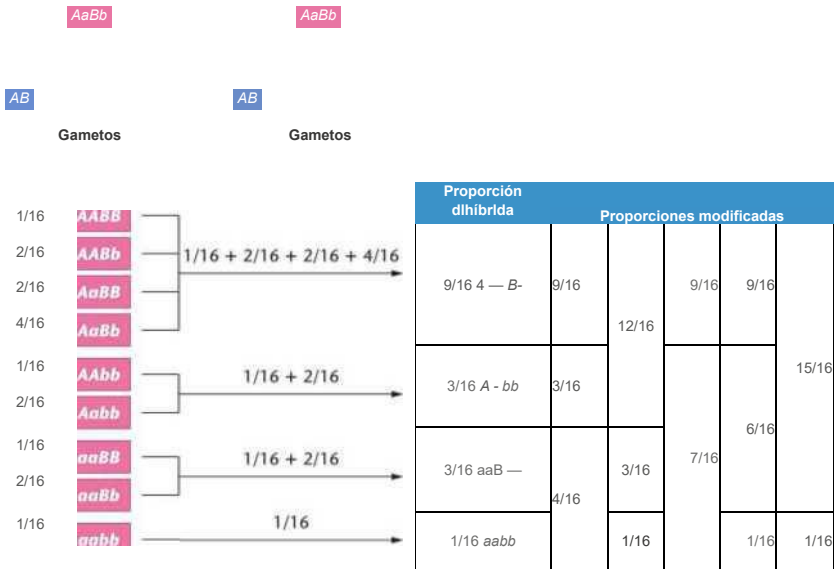


FIGURA 4.7 Obtención de varias proporciones dihíbridas modificadas a partir de los nueve genotipos que se producen en un cruce entre individuos heterocigotos para dos genes.

			Fenotipos F_2				
		Carácter	9/16	3/16	3/16	1/16	Proporción modificada
1	Ratones	Color del pelaje	agutí				9:3:4
2	Calabaza	Color	blanco		amarillo	verde	12:3:1
3	Guisante	Color de la flor	púrpura	blanco			9:7
4	Calabaza	Forma del fruto	discoidal	esférico		alargado	9:6:1
5	Gallinas	Color	blanco		con color	blanco	13:3
6	Ratones	Color	con manchas blancas	blanco	con color	con manchas blancas	10:3:3
7	Bolsa de pastor	Cápsula de la semilla	triangular			ovoide	15:1
8	Escarabajo de la harina	Color	6/16 negruzco y 3/16 rojo	negro	azabache	negro	6:3:3:4

FIGURA 4.8 Bases de las proporciones fenotípicas F, dihíbridas modificadas, que resultan del cruce entre individuos F, doblemente heterocigotos. Las cuatro agrupaciones de los genotipos F_2 que se muestran en la Figura 4.7 yen la parte superior de esta figura se combinan de diversas formas para producir estas proporciones.

3. Când presupunem că există o dominanță completă între alelele oricărei perechi de gene , astfel încât *AA* și *Aa, sau BB și Bb* sunt echivalente în efectele lor genetice, vom folosi notația *A* — sau B— pentru ambele combinații , unde cratima (—) indică faptul că oricare dintre alele poate fi prezentă, fără consecințe asupra fenotipului.
4. Toate încrucișările $_{P1}$ implică indivizi homozigoți (de exemplu, *AABB x aabb, AAbb* x ***aaBB*** sau *aaBB* x *AAbb).* Prin urmare, fiecare generație F1 constă doar din *genotipuri AaBb heterozigote.*
5. În fiecare exemplu, generația F2 $_{obținută}$ de la acești părinți heterozigoți va face obiectul analizei. Atunci când sunt implicate două gene (Figura 4.7), genotipurile F aparțin la patru categorii posibile: 9/16 *AB-,* 3/16 *A-bb,* 3/16 *aaB-* și 1/16 *aabb.* Datorită dominanței , toate genotipurile din fiecare categorie sunt echivalente în ceea ce privește efectele lor asupra fenotipului .

Cazul 1 este moștenirea culorii blănii la șoareci (Figura 4.8). Culoarea normală a blănii la șoareci este agouti , un model cenușiu format din benzi alternante de pigment în fiecare fir de păr *(vezi* Figura 4.4). Blana de Aguti este dominantă față de blana neagră (non-agouti), aceasta fiind cauzată de expresia homozigotă a unei mutații recesive, pe care o desemnăm ca *a.* Astfel, A— ne dă agouti, în timp ce *aa* ne dă blană neagră . Când o mutație recesivă, b, la un locus diferit este homozigotă, ea elimină complet pigmentarea , rezultând șoareci albinoși (bb), indiferent de genotipul de la locusul *a.* Prin urmare , într-o încrucișare între un agouti (AABB) și un albino *(aabb),* indivizii F1 sunt toți *AaBb* și au culoarea blănii agouti. În $_{urmași}$ F2 Dintr-o încrucișare între doi indivizi F, dublu heterozigoți , se observă următoarele genotipuri și fenotipuri :

Raportul $_{F2}$	Genotipuri	Fenotipuri
16 septembrie 3/16	*A- B-* *A-bb*	agouti albinos
3/16 1/16	*aa B-* *aa bb*	negru albinos

F,: *AaBb* X AaBb
1

Raportul fenotipic final

agouti din 16 septembrie
3/16 negru
4/16 albinoși

Putem vizualiza interacțiunea genetică care produce raportul observat 9:3:4 $_{în}$ F2 ca un proces în doi pași:

Pigmento	Patrón
negro	agutí

Moleculă precursoare (incoloră)

În prezența unei alele B , pigmentul negru se poate forma dintr - o substanță incoloră. În prezența unei alele A, pigmentul negru se depune în timpul dezvoltării părului într -un model care produce fenotipul agouti . Dacă genotipul este *aa,* tot părul este negru. Dacă

genotipul este bb , Nu se produce pigment negru ,

indiferent de prezența alelelor

A oa, șoarecele va fi albino. Prin urmare, genotipul homozigot *bb* maschează sau suprimă expresia alelei *A*.

Prin urmare, aceasta se numește *epistază recesivă*. O variantă a acesteia, numită *epistază dominantă,* apare atunci când o alelă dominantă la un locus genetic maschează expresia alelelor la un al doilea locus. De exemplu, Cazul *2* din Figura 4.8 se referă la moștenirea culorii fructului la dovleacul comun. Aici, alela dominantă A are ca rezultat un fruct alb, indiferent de genotipul de la un al doilea locus B. În absența alelei dominante A (genotipul aa *), BB* sau *Bb* au ca rezultat fructe galbene, în timp ce *bb* are ca rezultat fructe verzi. Prin urmare, dacă *se încrucișează doi* indivizi albi dublu heterozigoți (AaBb), apare un raport genetic interesant datorită acestei epistaze:

F,: *AaBb* X *AaBb*
!

Raportul $_{F2}$	Genotipuri	Fenotipuri	Raportul fenotipic final
16 septembrie	*A- B A- bb aa*	alb alb	
3/16	*Baa bb*	galben verde	12/16 alb
3/16			3/16 galben
1/16			1/16 verde

Dintre urmași, 9/16 sunt *AB- și* vor fi albi. Cei 3/16 care poartă genotipul *A~bb* vor fi, de asemenea, albi . Dintre dovlecii rămași, 3/16 vor fi galbeni *(aaB—),* în timp ce 1/16 va fi verde *(aabb).* Aceasta dă raportul fenotipic modificat de 12:3:1.

Al treilea exemplu al nostru (Cazul 3 din Figura 4.8), descoperit de William Bateson și Reginald Punnett (ai celebrului pătrat Punnett), este prezentat într-o încrucișare între două tulpini pure de plante de mazăre dulce cu flori albe. În mod neașteptat, toate plantele F1 au fost violete, iar în generația F2 , raportul a fost de 9/16 violet și 7/16 alb. Explicația propusă pentru acest rezultat sugerează că prezența a cel puțin unei alele dominante din fiecare dintre cele două perechi de gene este esențială pentru ca florile să fie violete. Prin urmare, acest caz este un exemplu de *interacțiune genetică complementară.* Toate celelalte combinații genotipice au ca rezultat flori albe, deoarece homozigoția pentru oricare dintre alelele recesive maschează expresia alelelor dominante la celălalt locus.

Intersecția este prezentată astfel:

F,: *AaBb* X *AaBb* alb *alb* J
Fp Toate *AaBb* (violet)

Raportul $_{F2}$	Genotipuri	Fenotipuri	Raportul fenotipic final
16 septembrie	*A- B-*	violet	
3/16	*A-bb*	alb	9/16 violet
3/16	*aa B-*	alb	7/16 alb
1/16	*aa bb*	alb	

Ne putem imagina cum două perechi de gene ar putea produce astfel de rezultate:

Gena B			Generația A	
Substanță precursor (incolor)	Yo ___ * *LA-*	Produs intermediar (incolor)	Yo ___ *B-*	Produs Sfârșit (violet)

Pentru a asigura atât transformările biochimice în produsul final , cât și pentru a produce flori mov, este necesară cel puțin o alelă dominantă în fiecare pereche de gene. În încrucișarea de mai sus, acest lucru se întâmplă la 9/16 dintre urmașii F1. Toate celelalte plante (7/16) vor avea flori albe.

Aceste trei exemple ilustrează pur și simplu modul în care produsele a două gene interacționează pentru a influența dezvoltarea unui fenotip comun . În alte exemple, mai mult de două gene, împreună cu produsele lor corespunzătoare , sunt implicate în controlul expresiei fenotipice .

Fenotipuri noi

Alte cazuri de interacțiune genetică produc noi fenotipuri în generația F2 , pe lângă producerea de rapoarte dihibride modificate. Cazul 4 din Figura 4.8 arată moștenirea formei fructului la dovleacul comun , *Cucurbita* pepo . Când plantele cu fructe în formă de disc (AABB) sunt încrucișate cu plante cu fructe alungite *(aabb),* Toată generația F1 are fructe discoidale. Cu toate acestea , la urmașii F2 Apare un fruct cu o formă nouă — sferică — precum și fructe care prezintă fenotipurile parentale. Aceste fenotipuri sunt prezentate în Figura 4.9.

FIGURA 4.9 Dovleci cu diverse fenotipuri de formă a fructelor, inclusiv discoidale, alungite și sferice.

Generația F2, cu un raport modificat de 9:6:1, este generată după cum urmează:

Ff *AaBb* X *AaBb* discoidal discoidal

Raportul F2	Genotipuri	Fenotipuri	Raportul fenotipic final
16 septembrie	*A- B A- bb*	sferic	
3/16	*aa B~ aa*	discoidal	9/16 discoidal
3/16	*bb*	sferic alungit	6/16 sferic
1/16			1/16 alungit

În acest exemplu de interacțiune genetică, ambele perechi de gene influențează în mod egal forma fructului. O alelă dominantă la oricare dintre locusuri asigură o formă sferică a fructului. În absența alelelor dominante, fructul este alungit. Cu toate acestea, dacă ambele alele dominante (A și B) sunt prezente, fructul este aplatizat sau are formă de disc.

ACUM REZOLVĂ ASTA

4.2 La unele plante, cianidina, un pigment roșu, este sintetizată dintr-un precursor incolor. Adăugarea unei grupări hidroxil (OH*) la cianidină are ca rezultat un pigment violet. Într-o încrucișare între două plante violete selectate aleatoriu, s-au obținut următoarele rezultate:

94 violet
31 de roșii
43 alb

Câte gene sunt implicate în determinarea culorii acestor flori? Ce combinații genotipice produc ce fenotipuri? Schițează încrucișarea violet x violet.

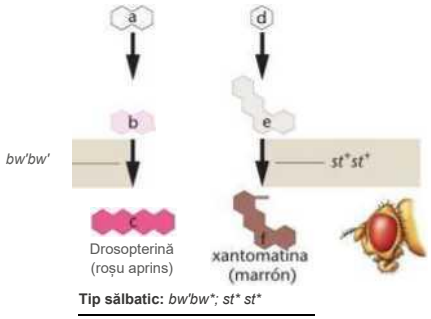
■ **SUGESTIE** - *Această problemă descrie o plantă în care culoarea florilor, o singură caracteristică, poate avea trei variante. Cheia rezolvării acesteia este să analizați mai întâi datele brute și să convertiți numerele în rapoarte semnificative. Acest lucru vă va ghida în determinarea câte perechi de gene sunt implicate. Apoi puteți grupa genotipurile într-un mod care să se potrivească rapoartelor genotipice.*

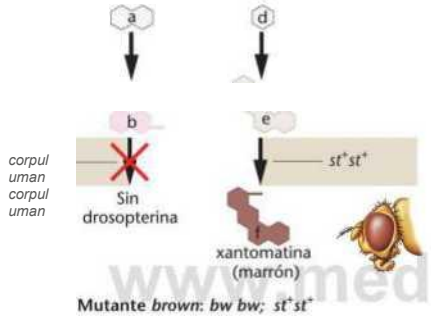
Un alt exemplu interesant, în care apare un fenotip neașteptat în generația F2 , este moștenirea culorii ochilor la *Drosophila melanogaster.* Ochiul de tip sălbatic este roșu cărămiziu. Când doi mutanți autozomal recesivi, *maro* și *stacojiu , sunt încrucișați* , - generația F1 are ochi de tip sălbatic. În generația F2 ,mușteleu cu ochi de tip sălbatic, stacojii, maro și albi se găsesc în raportul 9:3:3: 1. Deși acest raport este numeric același cu raportul dihibrid mendelian, încrucișarea la *Drosophila* implică o singură trăsătură: culoarea ochilor. Aceasta este o distincție importantă atunci când se studiază raporturile dihibride modificate care rezultă din interacțiunea genelor.

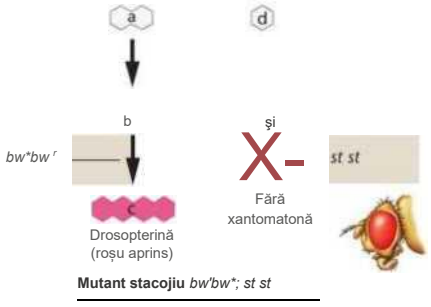
Încrucișarea la *Drosophila* Acesta este un exemplu excelent de interacțiune genetică , deoarece baza biochimică a culorii ochilor a fost determinată la acest organism (Figura 4.10). *Drosophila* , ca artropod tipic , are ochi compuși , alcătuiți din sute de unități vizuale individuale numite omatidii . Culoarea ochilor de tip sălbatic rezultă din depunerea și amestecarea a două grupuri distincte de pigment în fiecare omatidiu - pigmenții roșii aprins drosopterine și pigmenții maro xantomatine. Fiecare pigment este produs prin căi biochimice distincte . Fiecare etapă din fiecare cale este catalizată de o enzimă diferită și, prin urmare, este controlată de o genă diferită. După cum se arată în Figura 4.10 , mutația *maro* , În homozigoție, calea biochimică ce duce la sinteza pigmentului roșu aprins este perturbată . Deoarece rămâne doar xantomatina , culoarea ochilor este maro. Mutația stacojie , care afectează o genă situată pe un autosom diferit, perturbă calea ce duce la sinteza xantomatinei maro și are ca rezultat un ochi roșu aprins la musculițele mutante homozigote . Fiecare mutație are ca rezultat, aparent, producerea unei enzime nefuncționale. Sunt afectate și musculițele care sunt dublu mutante și, prin urmare, homozigote atât pentru xantomatina *maro, cât și pentru cea roșie* . ca și în cazul *Scarlet,* Le lipsesc ambele enzime funcționale și nu pot produce niciunul dintre pigmenți ; ele reprezintă noul fenotip al musculiței cu ochi albi , care apare în 1/16 din generația F2 . Rețineți că absența pigmentului la aceste musculițe nu se datorează mutației *albe* . legat de X , unde pigmenții pot fi sintetizați, dar precursorii necesari nu pot fi transportați către celulele care alcătuiesc omatidiile .

Alte raporturi dihibride modificate

rămase (5-8) din Figura 4.8 ilustrează modificări suplimentare ale raportului dihibrid și oferă exemple suplimentare de interacțiuni genetice. După cum se poate observa , sunt prezentate raporturile 13:3, 10:3:3, 15:1 și 6:3:3:4 . Aceste cazuri , la fel ca cele patru anterioare, au două lucruri în comun. În primul rând, ajungând la o explicație adecvată a modelului de moștenire pentru fiecare, nu încălcăm principiul segregării sau al sortării independente . În consecință , complexitatea adăugată la aceste modele de moștenire din aceste exemple nu invalidează concluziile mendeliene . În al doilea rând , în fiecare caz , raportul fenotipic în F2 Se exprimă în șaisprezecimi. Atunci când se fac observații similare în încrucișări în care modelul de moștenire este necunoscut, acestea sugerează că două perechi de gene controlează fenotipurile observate . Aceeași deducție poate fi făcută în analiza problemelor genetice . În secțiunea „ Idei și soluții ” de la sfârșitul acestui capitol, sunt furnizate idei suplimentare pentru rezolvarea problemelor.







00

Egalizator

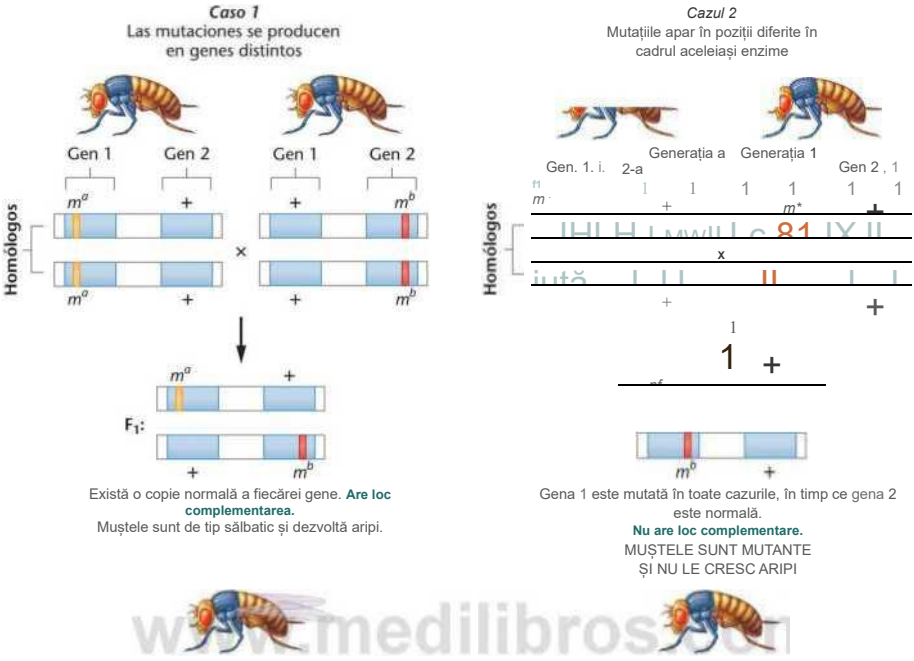
Analiza complementării ne permite să determinăm dacă două mutații care duc la același fenotip sunt alele ale aceleiași gene

O situație interesantă apare atunci când două mutații care au ca rezultat un fenotip similar sunt izolate independent . Să presupunem că doi cercetători, lucrând independent, izolează și stabilesc o tulpină pură de *Drosophia la.* fără aripi și demonstrează că fiecare fenotip mutant se datorează unei mutații recesive. Am putea presupune că ambele tulpini conțin mutații în aceeași genă. Cu toate acestea , deoarece știm că multe gene sunt implicate în formarea aripilor, trebuie să luăm în considerare și posibilitatea ca mutațiile în oricare dintre aceste gene să inhibe formarea aripilor în timpul dezvoltării . Acesta este cazul așa - numitelor *trăsături eterogene,* un concept introdus anterior în capitol, când am discutat despre surditatea ereditară . O procedură analitică numită **analiză de complementare** ne permite să determinăm dacă două mutații izolate se află în aceeași genă - adică, dacă sunt alele - sau dacă reprezintă mutații în gene diferite .

Pentru a clarifica, analiza noastră își propune să răspundă la această întrebare simplă: *dacă două mutații au ca rezultat fenotipuri similare , aceste două mutații sunt prezente în aceeași genă sau în două gene diferite?* Pentru a găsi răspunsul , am încrucișat cele două tulpini mutante și am analizat generația Fp. Figura 4.11 prezintă cele două rezultate alternative posibile, împreună *cu* interpretările lor. Pentru a analiza aceste posibilități (Cazul 1 și Cazul 2) , vom desemna fiecare dintre mutații ca *m* _a și *m*_b .

Cazul 1. *Toți urmașii dezvoltă aripi normale* . Interpretare: Cele două mutații recesive sunt localizate pe gene separate și nu sunt alele una ale celeilalte. După încrucișare , toate genele F1 sunt heterozigoți

FIGURA 4.10 Explicația teoretică a bazei biochimice a patru fenotipuri de culoare a ochilor care apar la o încrucișare între muște cu ochi *căprui și stacojii* de *Drosophila.* În prezența a cel puțin unei alele de tip sălbatic *bw'* , se produce o enzimă care transformă substanța b în c, iar pigmentul drosopterină este sintetizat . În prezența a cel puțin unei alele de tip sălbatic *st**, substanța e este convertită în f, iar pigmentul xantomatină este sintetizat. Prezența homozigotă a alelelor mutante recesive *bw* și *st blochează sinteza* acestor molecule de pigment , respectiv . Ambele căi, niciuna sau una dintre aceste căi poate fi blocată, în funcție de genotip.



www.medilibros.com

FIGURA 4.11 Analiza complementării diferitelor rezultate ale a două mutații fără aripi la *Drosophila (m')* și *m b).* În Cazul 1, mutațiile nu sunt alele ale aceleiași gene, în timp ce în Cazul 2 sunt .

pentru ambele gene. Deoarece fiecare mutație este localizată - într-o genă separată și deoarece fiecare Fj este heterozigot la ambele locusuri, se pot produce produși normali ai ambelor gene (datorită existenței unei copii normale a fiecărei gene), iar aripile se dezvoltă. În aceste circumstanțe, genele se completează reciproc în restabilirea fenotipului de tip sălbatic și spunem că are loc complementarea deoarece cele două mutații sunt în gene diferite.

Cazul 2. *Niciunul dintre urmași nu dezvoltă aripi.* Interpretare. Cele două mutații afectează aceeași genă și sunt alele una ale celeilalte. Complementarea nu are loc . Deoarece cele două mutații afectează aceeași genă, generația F1 va fi homozigotă pentru *ambele alele* mutante (alela *ni1 și* alela *mb). Nu se poate produce niciun produs genetic normal, iar în absența acestui produs esențial* , aripile nu se dezvoltă.

Analiza complementării, așa cum a fost dezvoltată inițial de geneticianul specializat în Drosophila, Edward *B.* Lewis, poate fi utilizată pentru a analiza orice număr de mutații individuale care au ca rezultat același fenotip. Această analiză poate dezvălui dacă este implicată o singură genă sau dacă sunt implicate două sau mai multe gene . Atunci când determinăm că sunt prezente mai multe mutații în aceeași genă, spunem că toate acele mutații aparțin aceluiași grup

de complementare, iar aceste mutații vor completa mutațiile aparținând tuturor celorlalte grupuri . Atunci când un număr mare de mutații afectează aceeași trăsătură și sunt studiate folosind analiza complementării, va fi posibil să se prezică numărul total de gene implicate în determinarea acelei trăsături.

4.10

Expresia unei singure gene poate avea efecte multiple

Deși secțiunile precedente s-au concentrat pe efectele pe care două sau mai multe gene le au asupra unei singure trăsături, situația opusă , în care expresia unei singure gene are multiple efecte fenotipice, este, de asemenea, destul de frecventă. Acest fenomen, care devine adesea evident atunci când fenotipurile sunt examinate cu atenție , se

numește pleiotropie. Putem extrage multe exemple excelente din bolile umane și vom analiza două astfel de cazuri pentru a ilustra acest punct.

Prima dintre aceste boli este sindromul Marfan , care provine dintr-o mutație autosomal dominantă a genei care codifică proteina țesutului conjunctiv *fibrilina* . Deoarece această proteină este distribuită pe scară largă în multe țesuturi ale corpului, este rezonabil să ne așteptăm ca acest defect să aibă efecte multiple . De fapt, fibrilina este importantă pentru integritatea structurală a cristalinului și a oaselor, precum și pentru căptușeala vaselor de sânge, cum ar fi aorta . Prin urmare, fenotipul asociat cu sindromul Marfan include dislocarea cristalinului, un risc crescut de anevrisme aortice și alungirea oaselor lungi ale membrelor . Această anomalie are interes istoric datorită speculațiilor că Abraham Lincoln a fost afectat.

boală autosomal dominantă, leucemia porfirică variegată. Persoanele afectate nu pot metaboliza corect porfirina din hemoglobină atunci când acest pigment respirator este degradat ca o consecință a înlocuirii globulelor roșii . Acumularea de porfirină în exces este imediat evidentă în urină, care capătă o culoare roșu intens. Cu toate acestea, această caracteristică fenotipică este doar diagnostică. Aspectele severe ale fenotipului se datorează naturii toxice a acumulării de porfirine în organism, în special în creier. Caracterizarea fenotipică completă include dureri abdominale , slăbiciune musculară, febră, puls rapid , insomnie, dureri de cap, probleme de vedere (care pot duce la orbire), delir și, în cele din urmă, convulsii. După cum se poate observa, este imposibil de decis care dintre trăsăturile fenotipice caracterizează cel mai bine boala .

La fel ca sindromul Marfan, porfiria pestriță are și ea o semnificație istorică. Se crede că George al III-lea, regele Angliei în timpul Războiului de Independență American , a suferit de episoade cu toate simptomele menționate anterior. În cele din urmă , a devenit orb și senil înainte de moartea sa.

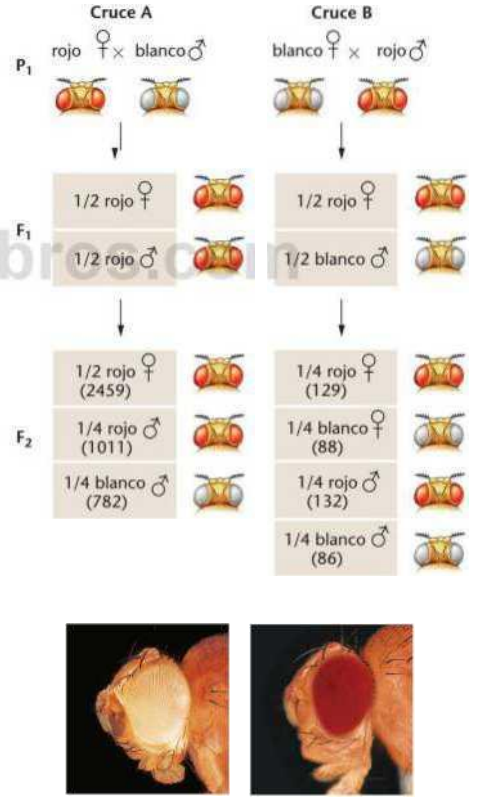
Există multe alte exemple care ar putea fi citate aici pentru a ilustra pleiotropia, dar este suficient să spunem că, dacă sunt analizate cu atenție , majoritatea mutațiilor prezintă mai mult de o manifestare atunci când sunt exprimate.

4.11

Legătura X descrie genele de pe cromozomul X

La multe specii de animale și la unele specii de plante, unul dintre sexe are o pereche diferită de cromozomi, care sunt implicați în determinarea sexului. De exemplu, atât la *Drosophila* , cât și la oameni, masculii au un cromozom X și un cromozom Y, în timp ce femelele au doi cromozomi X. Deși cromozomul Y trebuie să aibă o regiune de împerechere omoloagă cu cromozomul X, deoarece cei doi suferă sinapse și segregare în timpul meiozei, cea mai mare parte a cromozomului Y la oameni și la alte specii este considerată relativ inertă genetic. Deși recunoaștem o serie de gene specifice bărbaților pe cromozomul Y uman, acestuia îi lipsesc copii ale marii majorități a genelor prezente pe cromozomul X. Prin urmare, genele situate pe cromozomul X prezintă modele de moștenire unice în comparație cu genele autozomale . Termenul de legătură X este folosit pentru a descrie astfel de situații.

FIGURA 4.12 Rezultatele Fi și F2 ale încrucișărilor reciproce T. H. Morgan pentru mutația *albă* legată de X la *Drosophila melanogaster.* Datele reale sunt prezentate între paranteze. Fotografiile prezintă ochiul alb *și* ochiul roșu-cărămiziu de tip sălbatic.



În continuare, ne vom concentra asupra modelelor de moștenire genetică care rezultă din genele prezente pe cromozomul X, dar absente pe cromozomul Y. Această situație duce la o modificare a raporturilor mendeliene, care este tema centrală a acestui capitol.

Legătura X în *Drosophila*

Unul dintre primele cazuri de legătură X a fost documentat în 1910 de Thomas H. Morgan în timpul studiilor sale asupra mutației ochiului *alb* la *Drosophila.* (Figura 4.12). Culoarea normală a ochilor la păsările sălbatice este roșie și este dominantă față de culoarea albă a ochilor.

Studiul lui Morgan a stabilit că modelul de moștenire al trăsăturii de ochi albi era în mod clar legat de sexul părinților purtători ai alelei mutante. Spre deosebire de rezultatele unei încrucișări monohibride mendeliene tipice, unde generațiile F1 și F2 au fost foarte similare, indiferent de părintele (P) care a exprimat trăsătura mutantă recesivă, încrucișările reciproce între musculițele cu ochi albi și cele cu ochi roșii nu au produs aceleași rezultate. Analiza lui Morgan a concluzionat că locusul *alb* este localizat pe cromozomul X, mai degrabă decât pe unul dintre autozomi. Prin urmare, atât gena, cât și trăsătura se consideră a fi legate de cromozomul X.

Figura 4.12 prezintă rezultatele încrucișărilor reciproce între musculițele cu ochi albi și musculițele cu ochi roșii . Diferențele evidente în raporturile fenotipice , atât în F1, cât și în F2 , depind de faptul dacă părintele cu ochi albi al speciei Pt. a fost bărbat sau femeie?

Morgan a reușit să coreleze aceste observații cu diferențele pe care le -a găsit în compoziția cromozomilor *sexuali* între Drosophila masculină și feminină . El a emis ipoteza că alela recesivă pentru ochii albi este localizată pe cromozomul X , în timp ce locusul corespunzător este absent pe cromozomul Y. Prin urmare, femelele aveau două locusuri genetice , câte unul pe fiecare cromozom X, în timp ce masculii aveau un singur locus pe un singur cromozom X.

Interpretarea lui Morgan asupra moștenirii legate de X , prezentată în Figura 4.13, oferă o explicație teoretică adecvată pentru rezultatele sale. Deoarece cromozomul Y nu prezintă omologie pentru majoritatea genelor găsite pe cromozomul X , orice alelă prezentă pe cromozomul X la bărbați va fi exprimată direct în fenotip . Deoarece bărbații nu pot fi nici homozigoți , nici heterozigoți pentru genele legate de X , folosim în schimb termenul de hemizigozitate pentru a ne referi la starea lor - posedarea unei singure copii a unei gene într -o celulă altfel diploidă. Spunem că individul este hemizigot . O consecință a legăturii cu X este modelul de *încrucișare* al *moștenirii ,* în care trăsăturile fenotipice controlate de genele recesive legate de X sunt transmise de la mamele homozigote la toți fiii .

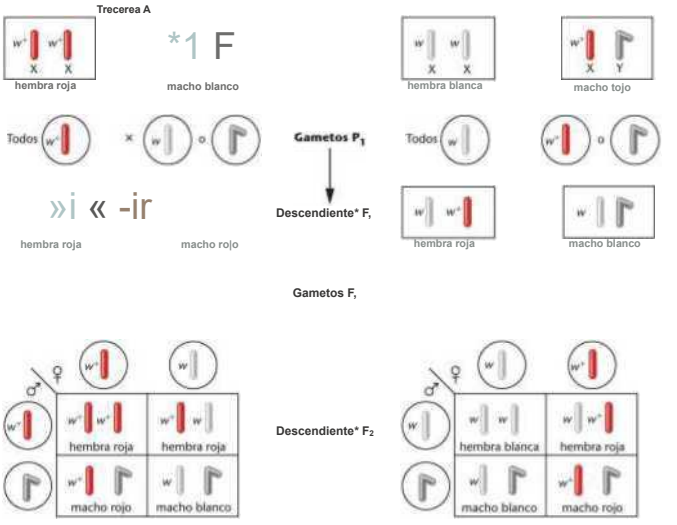


FIGURA 4.13 Explicație cromozomială a rezultatelor încrucișărilor legate de X din Figura 4.12.

masculi. Acest model apare deoarece femelele care exprimă o trăsătură recesivă au alele mutante pe ambii cromozomi X. Deoarece urmașii masculi primesc unul dintre cei doi cromozomi X de la mama lor și sunt hemizigoți pentru toate alelele prezente pe acel cromozom X, toți urmașii masculi vor exprima aceeași trăsătură recesivă legată de X ca și mama lor.

Munca lui Morgan a avut o mare semnificație istorică . Până în 1910, corelația dintre munca lui Mendel și comportamentul cromozomilor în meioză a pus bazele teoriei cromozomiale a moștenirii. Munca lui Morgan, și mai târziu cea a elevului său Calvin Bridges în jurul anului 1920, au furnizat dovezi directe că genele sunt transmise pe cromozomi specifici, ceea ce este considerat prima dovadă experimentală solidă în sprijinul acestei teorii.

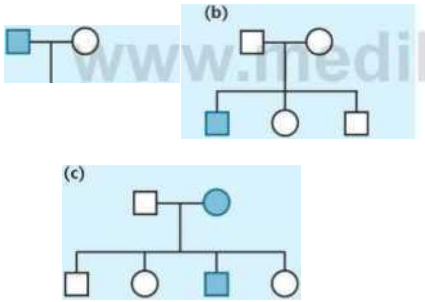
4.3 Mai jos sunt prezentate trei genealogii. Luați în considerare, în fiecare caz, dacă genealogia este compatibilă cu o trăsătură recesivă legată de

I AHORA RESUELVA ESTO |

cromozomul X. Într-una sau două propoziții, precizați de ce sau de ce nu.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică potențiale trăsături recesive legate de cromozomul X, așa cum sunt analizate în pedigree. Cheia soluției sale constă în concentrarea asupra hemizigozității, unde o alelă recesivă legată*

(a)



de cromozomul X este întotdeauna exprimată la bărbați, dar nu este niciodată transmisă de la tată la fiii săi. Pe de altă parte, femelele homozigote transmit trăsătura tuturor fiilor, dar nu și fiicelor, cu excepția cazului în care și tatăl este afectat.

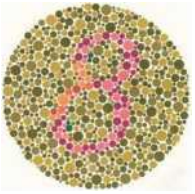
Legătura X la specia umană

La oameni, multe gene, împreună cu trăsăturile respective pe care le controlează, sunt cunoscute ca fiind legate de cromozomul X (a se vedea tabelul 4.2). Aceste trăsături legate de cromozomul X pot fi ușor identificate în genealogii datorită modelului lor încrucișat de moștenire. Figura 4.14 prezintă un pedigree pentru un tip de - daltonism la oameni. Mama din generația I transmite trăsătura tuturor fiilor săi , dar niciunei dintre fiice. Dacă urmașii din generația a II-a se căsătoresc cu indivizi normali , fiii daltoniști vor produce urmași care sunt toți normali (III-1, 2 și 3); fiicele cu vedere normală vor produce fiice cu vedere normală (III - 4, 6 și 7); și fii care sunt atât daltoniști (III-11 , 8) , cât și normali (III-5).

Din cauza modului în care sunt transmise genele legate de cromozomul X , unele circumstanțe neobișnuite pot fi asociate cu anomalii recesive legate de cromozomul X în comparație cu anomaliile autozomale. De exemplu, dacă o anomalie legată de cromozomul X slăbește sau este letală pentru individul afectat înainte ca acesta să atingă maturitatea reproductivă, anomalia...

Caracteres ligados al X en la especie humana

Anomalía	Características
Ceguera para los colores, tipo deuteranopia	Insensibilidad a la luz verde.
Ceguera para los colores, tipo protanopia	Insensibilidad a la luz roja.
Enfermedad de Fabry	Deficiencia de la galactosidasa A; defectos en corazón y riñones, muerte temprana.
Deficiencia de la G-6-PD	Deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; reacción anémica grave después de la ingestión de primaquinas en sustancias químicas o en ciertos alimentos, como las habas.
Hemofilia A	Forma clásica de la deficiencia en la coagulación sanguínea; carencia del factor de coagulación VIII.
Hemofilia B	Deficiencia del factor de coagulación IX; enfermedad «Christmas».
Síndrome de Hunter	Enfermedad del almacenamiento de mucopolisacáridos producida por la deficiencia en la enzima iduronato sulfatasa; estatura baja, dedos como garras, rasgos faciales toscos, deterioro mental lento y sordera.
Ictiosis	Deficiencia de la enzima esferoide sulfatasa; piel reseca y escamosa, particularmente en las extremidades.
Síndrome de Lesch-Nyham	Deficiencia de la enzima hipoxantin-guanosin fosforibosil transferasa (HPRT), que da lugar a retraso mental y motor, automutilación y muerte temprana.
Distrofia muscular	Enfermedad progresiva, que acorta la vida, caracterizada por degeneración muscular y debilidad (tipo Duchenne) a veces asociada con retraso mental; deficiencia de la proteina distrofina.



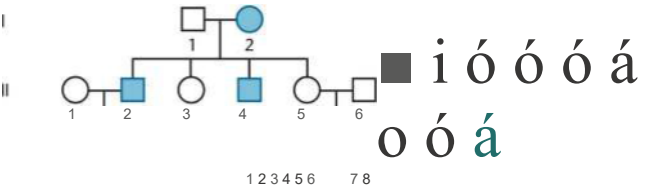


FIGURA 4.14 O genealogie umană pentru trăsătura de daltonism legată de cromozomul X. Fotografia este o diagramă Ishihara pentru daltonismul specific , care verifică daltonismul roșu-verde . Persoanele care sunt orbite la roșu-verde văd un 3 în loc de 8, văzut de cei cu vedere normală a culorilor .

Va apărea exclusiv la bărbați. Acest lucru se datorează faptului că singura sursă de alele letale din populație sunt femeile heterozigote care sunt „purtătoare" și nu exprimă tulburarea. Ele transmit alela la jumătate dintre fiii lor, care dezvoltă boala deoarece sunt hemizigoți, dar foarte rar se reproduc. Femeile heterozigote transmit, de asemenea, alela la jumătate dintre fiicele lor care, la fel ca mamele lor, devin purtătoare, dar fără a dezvolta boala. Un exemplu de astfel de boală legată de cromozomul X este *distrofia musculară - Duchenne* . Această boală începe să se manifeste înainte de vârsta de șase ani și este adesea fatală în jurul vârstei de 20 de ani. De obicei, apare doar la bărbați.

4.12

În moștenirea limitată de sex și cea influențată de sex, sexul individului influențează fenotipul.

Spre deosebire de moștenirea legată de cromozomul X, modelele de expresie genică pot fi afectate de sexul unui individ chiar și atunci când genele nu sunt localizate pe cromozomul X. În numeroase exemple la diferite organisme, sexul individului joacă un rol determinant în exprimarea unui fenotip. În unele cazuri, exprimarea unui fenotip specific este absolut limitată la un singur sex; în altele, sexul unui individ influențează exprimarea unui fenotip care nu este limitat la niciunul dintre sexe. Această distincție ne permite să diferențiem între moștenirea limitată de sex și moștenirea influențată de sex.

În ambele tipuri de moștenire, genele autozomale sunt responsabile pentru existența unor fenotipuri alternative, dar expresia acestor gene depinde de structura hormonală a individului. Astfel, genotipul heterozigot poate manifesta un fenotip la masculi și fenotipul alternativ la femele. De exemplu, la păsările de curte, penele cozii și ale gâtului sunt adesea foarte diferite la femele și masculi.

FIGURA 4.1 Penajul găinii (stânga) și al cocoșului (dreapta) la păsările de curte. Penele găinii sunt mai scurte și mai puțin curbate.

La masculi (Figura 4.15), acesta constituie un exemplu de moștenire limitată de sex. Penajul cocoșului este mai lung, mai curbat și mai ascuțit decât cel al găinii, care este mai scurt și mai rotunjit. Moștenirea acestor fenotipuri depinde de o singură pereche de alele autozomale, a căror expresie este modificată de hormonii sexuali ai individului. După cum se arată în tabelul următor, penajul de tip găină se datorează unei alele dominante, H, dar indiferent de prezența homozigotă a alelei recesive h , toate femelele au penaj de tip găină . Doar la masculi se manifestă genotipul *hh* Acest lucru are ca rezultat un penaj asemănător unui cocoș .

Genotip	Fenotip	
	9	
HH	Penaj de pui	Penaj de pui
Hh	Penaj de pui	Penaj de pui
hh	Penaj de pui	Penajul cocoșului

La anumite rase de păsări de curte, alela pentru penajul de găină sau

cocoș a devenit fixă în populație . În *rasa Leghorn,* toți indivizii au *genotipul hh;* prin urmare, masculii și femelele se disting prin penajul lor diferit . Toți puii bantam *Seabright au genotipul HH și* nu prezintă dimorfism sexual în penaj .

moștenire limitată de sex implică genele autozomale responsabile de producția de lapte la bovine. Indiferent de genotipul general care influențează cantitatea de lapte produsă, aceste gene sunt evident exprimate doar la vaci.

Exemple de *moștenire influențată de sex* includ modelul de chelie la oameni , formarea coarnelor la anumite rase de oi (de exemplu, *oile Dorsett Horn) și* anumite modele de blană la bovine. În astfel de cazuri, genele autozomale sunt responsabile pentru fenotipurile alternative și, deși trăsătura poate fi exprimată atât de femele, cât și de masculi, expresia acestor gene depinde de - constituția hormonală a indivizilor. Astfel, genotipul heterozigot prezintă un fenotip la un sex și fenotipul alternativ la celălalt. De exemplu, chelia la oameni , unde părul este foarte fin sau absent pe vârful capului (Figura 4.16), se moștenește după cum urmează:

Genotip	Fenotip	
	9	
BB	Chel	Chel
Bb	Nu chel	Chel
bb	Nu chel	Nu chel

Deși femeile pot experimenta chelie, acest fenotip este mult mai răspândit la bărbați. Când

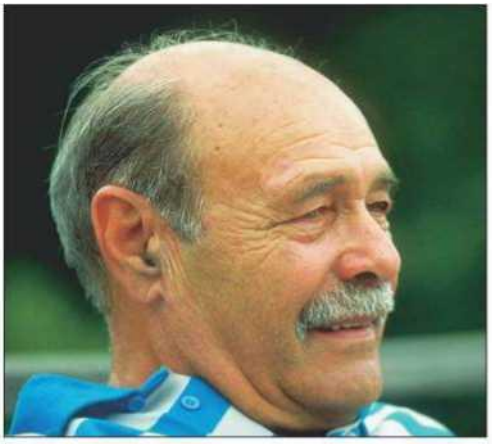


FIGURA 4.16 Model de chelie, o trăsătură autosomală influențată de sex la specia umană.

Femeile moștenesc genotipul *BB ;* fenotipul este mult mai puțin pronunțat decât la bărbați și se exprimă mai târziu.

Fundalul genetic *și* mediul pot modifica expresia fenotipică

În secțiunea finală a acestui capitol, vom analiza *expresia fenotipică.* În capitolele 2 și 3, am presupus că genotipul unui organism este întotdeauna exprimat direct în fenotipul său. De exemplu, mazărea homozigotă pentru alela recesivă *d (dd)* va fi întotdeauna pitică. Am analizat expresia genelor ca și cum genele ar acționa într-un sistem închis, unde prezența sau absența produselor funcționale a determinat direct fenotipul general al unui individ. În realitate, situația este mult mai complexă. Majoritatea produselor genetice - acționează în interiorul celulei, iar celulele interacționează între ele în diverse moduri. Mai mult, organismul trebuie să supraviețuiască unei varietăți de influențe de mediu. Astfel, expresia genelor și fenotipul rezultat sunt adesea modificate de interacțiunea dintre - genotipul specific al individului și mediul extern. În această secțiune finală a capitolului, vom discuta despre unele dintre variabilele - cunoscute ca modificând expresia genelor.

Penetrare și expresivitate

Unele genotipuri mutante exprimă întotdeauna un fenotip clar, în timp ce altele au ca rezultat o proporție de indivizi ale căror fenotipuri sunt indistinguibile de fenotipul normal (tipul sălbatic). Gradul de exprimare al unei trăsături specifice poate fi studiat cantitativ, determinând *penetranța* și *expresivitatea* genotipului investigat.

Procentul de indivizi care prezintă, cel puțin într-o oarecare măsură, expresia unui genotip mutant definește penetranța mutației. De exemplu, expresia fenotipică a multor alele mutante la *Drosophila* este imposibil de distins de tipul sălbatic. Dacă 15% dintre mușteleare posedă un anumit genotip mutant prezintă - aspectul de tip sălbatic, spunem că gena mutantă are o penetranță de 85 %.

În schimb, expresivitatea reflectă gradul *de expresie al* genotipului mutant. Mușteleomozigote pentru gena mutantă recesivă *„eyeless"* dau naștere la fenotipuri care variază de la prezența ochilor normali la o reducere parțială a dimensiunii acestora, până la absența completă a unuia sau a ambilor ochi (Figura 4.17). Deși reducerea medie a dimensiunii ochilor este de un sfert până la jumătate, intervalul de expresivitate

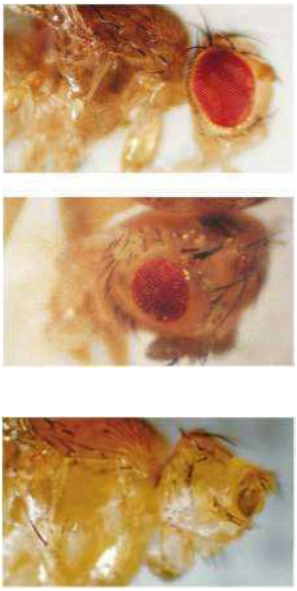


FIGURA 4.17 Expresivitate variabilă la musculițe homozigote pentru mutația *fără ochi* a *genei Drosophila.* Gradația intervalului fenotipic merge de la tipul sălbatic la reducere parțială și absența totală a ochilor.

Aceasta variază de la absența completă a ambilor ochi până la ochi complet normali. Exemple similare cu expresia fenotipului *fără ochi* au oferit baza pentru proiectarea experimentelor pentru a determina cauzele variației fenotipice. Dacă mediul de laborator este menținut constant și se observă în continuare o gamă largă de variații, alte gene pot influența sau modifica fenotipul. Pe de altă parte, dacă fondul genetic nu este cauza variației fenotipice , pot fi implicați factori de mediu precum temperatura, umiditatea sau nutriția. În cazul *fenotipului fără ochi,* s-a stabilit experimental că atât fondul genetic, cât și factorii de mediu influențează expresia acestuia.

Fundal genetic: efecte poziționale

Deși este dificil de estimat efectul specific al fondului genetic asupra expresiei unei gene responsabile de determinarea unui potențial fenotip, unul dintre efectele fondului genetic, numit efectul de poziție, a fost foarte bine caracterizat. În astfel de cazuri, poziția fizică a unei gene în raport cu alt material genetic poate influența expresia acesteia. De exemplu, dacă o regiune cromozomială este relocată sau rearanjată (un eveniment numit translocație sau inversie), expresia normală a genelor din acea regiune cromozomială poate fi modificată. Acest lucru este valabil mai ales dacă gena este localizată în sau în apropierea anumitor zone ale cromozomilor care sunt condensate și inerte genetic, numite regiuni heterocromatice .

Un exemplu de astfel *de* efect de poziție apare la femelele Drosophila heterozigote pentru mutantul de culoare albă *(w) al ochilor* , recesiv și legat de cromozomul X. Genotipul w^+ *lw* Acest lucru are ca rezultat, în mod normal, o culoare a ochilor roșu-cărămiziu , de tip sălbatic . Cu toate acestea , dacă regiunea cromozomului X care poartă alela de tip sălbatic w^+ este translocată astfel încât să se afle în apropierea unei regiuni heterocromatice, expresia alelei iv^+ este modificată . În loc să fie roșii, ochii sunt pestriți sau pătați, cu pete roșii și albe (Figura 4.18). Astfel , după translocație , efectul dominant al alelei iv^+ normale este diminuat. Este intermitent. Un efect de poziție similar apare dacă o regiune heterocromatică este relocată lângă locusul *alb de pe* cromozomul X. Se pare că regiunile heterocromatice inhibă exprimarea genelor adiacente . Loci-urile din multe alte organisme prezintă , de asemenea , efecte de poziție , dovedind că modificarea aranjamentului normal al informațiilor genetice poate modifica expresia acestora .

Efectele temperaturii: o introducere în mutațiile condiționate

Activitatea chimică depinde de energia cinetică a substanțelor care reacționează , care , la rândul ei , depinde de

(la)

(b)

FIGURA 4.18 Efectul poziției, așa cum s-a observat în fenotipul ocular la două femele de Drosophila , heterozigote pentru gena *albă* , (a) Fenotip dominant normal , cu ochi roșu-cărămiziu, (b) Culoare pestriță a ochilor, cauzată de translocarea genei *albe* într-o altă locație din genom.

Prin urmare, este rezonabil să ne așteptăm ca temperatura să influențeze fenotipurile. Un exemplu este luminița de seară, care produce flori roșii atunci când este crescută la 23°C și flori albe la 18°C. Un exemplu și mai izbitor este observat la pisicile siameze și iepurii himalayeni, care au blană închisă la culoare pe anumite părți ale corpului unde temperatura corpului este puțin mai scăzută, în special pe nas, urechi și labe (Figura 4.19). În aceste cazuri, se pare că enzima responsabilă în mod normal pentru formarea pigmentului este funcțională doar la temperaturile mai scăzute întâlnite la extremități, dar își pierde funcția catalitică la temperaturile puțin mai ridicate întâlnite în restul corpului.

Mutațiile a căror expresie este afectată de temperatură se numesc mutații condiționate și sunt denumite sensibile la temperatură . În aceste cazuri, expresia fenotipică este determinată de condițiile de mediu. Exemple de mutații sensibile la temperatură sunt cunoscute la virusuri și la o serie de organisme, cum ar fi bacteriile, fungii și *Drosophila.* În cazuri extreme, un organism purtător al unei alele mutante poate exprima un fenotip mutant atunci când este crescut la o anumită temperatură, dar poate exprima fenotipul de tip sălbatic atunci când este crescut la o temperatură diferită. Acest tip de efect al temperaturii este util pentru studierea mutațiilor care perturbă - procesele esențiale de dezvoltare și, prin urmare, sunt de obicei dăunătoare organismului sau chiar letale. De exemplu, dacă virusurile bacteriene sunt crescute în *condiții permisive* de 25 °C, produsul genei mutante va fi funcțional, iar infecția va progresa.

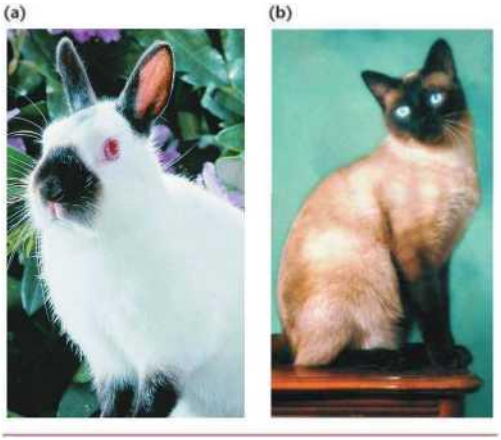


FIGURA 4.19 (a) Iepure himalayan, (b) Pisică siameză. Ambele au blană închisă la culoare pe urechi, nas și labe. Acest model se datorează efectului unei alele sensibile la temperatură, responsabilă de producerea de pigmenți.

, se vor produce noi virusuri, care pot fi apoi studiate. Cu toate acestea, dacă virusurile bacteriene cu astfel de mutații sensibile la temperatură infectează bacteriile crescute la 42 °C - condiția *restrictivă* - infecția progresează până când este necesar produsul genetic esențial (de exemplu, pentru asamblarea virusului) și apoi se oprește . Mutațiile sensibile *la* temperatură pot fi ușor induse și izolate în virusuri și au îmbunătățit considerabil studiul geneticii virale .

Efectele nutriției

O altă clasă de fenotipuri care sunt întotdeauna o reflectare directă a genotipului organismului sunt mutațiile nutriționale. La microorganisme, mutațiile care împiedică sinteza moleculelor de nutrienți sunt foarte frecvente , cum ar fi atunci când o enzimă esențială dintr-o cale metabolică este inactivată. Un microorganism purtător al unei astfel de mutații se numește auxotrof. Dacă produsul final al unei căi biochimice nu poate fi sintetizat și dacă acea moleculă este esențială pentru creșterea și dezvoltarea normală, mutația va împiedica creșterea și poate fi letală . De exemplu , dacă mucegaiul de pâine Neurospora nu poate sintetiza aminoacidul leucină , proteinele nu pot fi *sintetizate* . Dacă leucina este prezentă în mediul de cultură , efectul negativ va fi depășit. Mutanții nutriționali au fost cruciali în studiul geneticii bacteriene și au servit drept bază pentru propunerea lui George Beadle și Edward Tatum de la începutul anilor 1940 , conform căreia una dintre funcțiile unei gene este de a produce o enzimă *(vezi* Capitolul 14).

La om , sunt cunoscute o serie de circumstanțe ușor diferite . Ingestia anumitor substanțe din dietă, pe care indivizii normali le pot consuma fără probleme, poate afecta grav persoanele cu constituții genetice anormale . Adesea , o mutație poate împiedica un individ să metabolizeze o substanță care se găsește în mod normal în dietă. De exemplu, cei afectați de tulburarea genetică fenilcetonurie nu pot metaboliza aminoacidul fenilalanină. Cei cu galactozemie nu pot metaboliza galactoza . Cei cu intoleranță la lactoză nu pot metaboliza lactoza. Cu toate acestea , dacă aportul moleculei corespunzătoare din dietă este redus drastic sau eliminat , fenotipul asociat poate fi îmbunătățit.

Debutul expresiei genelor

Nu toate trăsăturile genetice sunt exprimate în același timp pe parcursul vieții unui organism. În multe cazuri , vârsta la care o genă mutantă exercită o influență vizibilă asupra fenotipului depinde de evenimentele care au loc în timpul secvenței normale de creștere și dezvoltare . La oameni , fazele prenatale, copilăriei, juvenile și adulte necesită informații genetice diferite . Prin urmare, multe

boli grave ereditare nu se manifestă decât după naștere. De exemplu, așa cum am văzut în Capitolul 3, boala Tay-Sachs, care este moștenită ca trăsătură autosomal recesivă, este o tulburare fatală a metabolismului lipidic cauzată de o enzimă anormală, hexosaminidaza A. Nou-născuții apar fenotipic normali în primele luni. Ulterior, apar întârzieri de dezvoltare, paralizie și orbire, iar majoritatea copiilor afectați mor în jurul vârstei de trei ani .

Sindromul Lesch-Nyhan, moștenit ca o tulburare recesivă legată de cromozomul X, este caracterizat printr- un metabolism anormal al acidului nucleic (incapacitatea de a reprocesa bazele azotate purinice), ceea ce duce la acumularea de acid uric în sânge și țesuturi, dizabilitate intelectuală, paralizie și automutilare a buzelor și degetelor. Boala este cauzată de o mutație a genei care codifică hipoxantin-guanozin fosforiboziltransferaza (HPRT). Nou-născuții sunt normali până la vârsta de șase până la opt luni, înainte de apariția primelor simptome.

Un alt exemplu este distrofia musculară Duchenne (DMD), o boală recesivă legată de cromozomul X, asociată cu atrofie musculară progresivă. De obicei, nu este diagnosticată până când copilul nu are între trei și cinci ani. Chiar și cu intervenție medicală și resursele actuale, boala este adesea fatală până la vârsta de douăzeci de ani.

Probabil cea mai întârziată și variabilă vârstă de debut dintre toate bolile ereditare umane este boala Huntington. Aceasta este moștenită ca o trăsătură autosomal dominantă și afectează lobii frontali ai cortexului cerebral, unde moartea celulară progresivă are loc pe parcursul a mai mult de un deceniu. Deteriorarea creierului este însoțită de mișcări spasmodice necontrolate, declin intelectual și, în cele din urmă, moarte. Deși aceste simptome au fost observate la orice vârstă, ele apar cel mai frecvent inițial între 30 și 50 de ani, cu o vârstă medie de debut de 38 de ani. Aceste exemple susțin conceptul că produsele genetice pot juca roluri mai esențiale în anumite momente ale vieții unui organism. Un individ poate fi capabil să tolereze impactul unei gene mutante pentru o perioadă considerabilă de timp fără niciun efect perceptibil. La un moment dat, însă, se manifestă un fenotip mutant. Acest lucru poate fi rezultatul faptului că mediul fiziologic intern al unui organism - variază în timpul dezvoltării și odată cu vârsta .

Anticiparea genetică

Interesul pentru studierea debutului genetic al expresiei fenotipice s-a intensificat odată cu descoperirea tulburărilor ereditare care *se manifestă la vârste progresiv mai tinere și în care severitatea bolii crește cu fiecare generație succesivă.* Acest fenomen se numește anticipare genetică.

Distrofia miotonică (MD), cel mai frecvent tip de distrofie musculară la adulți, ilustrează în mod clar anticiparea genetică . Persoanele afectate de această boală autosomal dominantă prezintă o variație enormă în ceea ce privește severitatea simptomelor . Persoanele ușor afectate dezvoltă cataractă la vârsta adultă , cu puțină sau deloc slăbiciune musculară. Persoanele sever afectate prezintă o slăbiciune mai mare, precum și miotonie (hiperexcitabilitate musculară) și, în unele cazuri , dizabilitate intelectuală. În forma sa cea mai extremă, boala este fatală la scurt timp după naștere . Un interes sporit a apărut în 1989 , când C. J. Howeler și colegii săi au confirmat corelația dintre creșterea severității și debutul mai precoce odată cu generațiile succesive de moștenire. Cercetătorii au studiat 61 de perechi părinte-copil , iar în 60 dintre cazuri , vârsta debutului simptomelor a fost mai devreme , iar simptomele au fost mai severe la copii decât la părintele (părinții) afectat (i).

În 1992, a fost formulată o explicație atât pentru cauzele moleculare ale mutației responsabile de diabetul zaharat (DZ) , cât și pentru baza anticipării genetice a bolii. După cum vom vedea în Capitolul 15, o secvență scurtă de ADN (3 nucleotide) a genei DZ se repetă de un număr variabil de ori și este instabilă . Persoanele normale au între 5 și 35 de copii ale acestei secvențe; persoanele afectate au între 80 și peste 2.500 de copii. Cei cu un număr mai mare de repetiții sunt mai grav afectați . Cea mai remarcabilă observație a fost că, în generațiile succesive de indivizi cu DZ, dimensiunea segmentului care conține repetițiile a crescut . Acum știm că ARN-ul transcris din genele DZ mutante este responsabil pentru boală și , la rândul său , modifică expresia altor gene . Vom reveni la acest subiect în Capitolul 15. Alte tulburări ereditare umane , cum ar fi sindromul X fragil, boala Kennedy și boala Huntington , dezvăluie , de asemenea , o asociere între dimensiunea unor regiuni specifice ale genei responsabile și severitatea bolii .

Amprentarea genomică (paternă) și reducerea la tăcere a genelor

Un ultim exemplu legat de fondul genetic este ceea ce se numește imprimare genomică *(* sau paternă) , în care un proces selectiv de reducere la tăcere a genelor are loc în timpul dezvoltării incipiente , *influențând* exprimarea genotipică ulterioară . Exemplele includ cazuri în care gene sau regiuni ale unui cromozom sunt reduse la tăcere pe un omolog , dar nu și pe celălalt . Impactul reducerii la tăcere depinde de originea paternă a genelor sau regiunilor implicate. Această reducere la tăcere duce la exprimarea genotipică directă a alelei sau alelelor situate pe omologul

care nu a fost redus la tăcere. Prin urmare, se crede că procesul de imprimare, o problemă centrală pentru înțelegerea acestui fenomen, are loc înainte sau în timpul formării gameților, ducând la marcarea diferită a genelor (sau regiunilor cromozomiale) în țesutul care dă naștere spermatozoizilor și în țesutul care formează ovulele.

Primul exemplu de imprimare genomică a fost descoperit în 1991 în trei gene specifice șoarecilor. Una dintre acestea este gena care codifică factorul de creștere asemănător insulinei II (fgf2). Un șoarece care poartă două alele normale ale acestei gene va avea dimensiuni normale, în timp ce un șoarece care poartă două alele mutante va lipsi factorul de creștere și va fi pitic. Mărimea unui șoarece heterozigot - o alelă normală și o alelă mutantă - depinde de originea paternă a alelei de tip sălbatic. Șoarecele va avea dimensiuni normale dacă alela normală provine de la tată, dar va fi pitic dacă alela normală provine de la mamă. Din aceasta, se poate deduce că gena *Igf2* este imprimată și, prin urmare, redusă la tăcere , în timpul producției de ovule, dar funcționează normal atunci când trece prin țesutul producător de spermă la masculi. Imprimarea este moștenită în sensul că gena *Igf2* din toate celulele descendente - formate în timpul dezvoltării rămâne redusă la tăcere. Imprimarea în generația următoare va depinde apoi de dacă gena trece prin țesutul producător de spermă sau de ovule.

Un exemplu la om implică două tulburări genetice distincte despre care se crede că sunt cauzate de imprimarea diferențială a aceleiași regiuni a brațului lung al cromozomului 15 (15q1). În ambele cazuri, tulburările rezultă dintr-o deleție identică a acestei regiuni pe unul dintre membrii perechii de cromozomi 15. Prima tulburare, sindromul Prader-Willi (SPW), apare atunci când segmentul patern este șters, iar cromozomul matern rămâne intact. Dacă segmentul matern este șters și rămâne un cromozom patern intact, rezultă o tulburare complet diferită, sindromul Angelman (SA) .

Fenotipic, cele două tulburări sunt în mod clar diferite. Sindromul Prader-Willi (SPW) este caracterizat prin dizabilitate intelectuală, o tulburare alimentară severă, marcată de apetit incontrolabil, obezitate, diabet și retard de creștere . Sindromul Angelman provoacă, de asemenea, dizabilitate intelectuală , dar această tulburare este caracterizată prin contracții musculare involuntare (coree) și convulsii. Se poate concluziona că regiunea relevantă a cromozomului 15 este imprimată diferit la gameții masculini și feminini și că, pentru o dezvoltare normală , nici regiunea maternă , nici cea paternă nu trebuie șterse.

Deși rămân multe întrebări cu privire la amprentarea genomică , este acum clar că multe gene sunt supuse acestui proces. Până în prezent, peste 50 au fost identificate la mamifere . Se pare că regiunile cromozomiale , mai degrabă decât gene specifice , sunt imprimate . Acest fenomen exemplifică subiectul mai larg al epigeneticii , în care expresia genelor nu *este un* rezultat direct al informațiilor stocate în secvența de nucleotide a ADN-ului. În schimb , ADN-ul este modificat în moduri care afectează expresia genelor. Aceste modificări sunt stabile prin faptul că sunt transmise în timpul diviziunii celulare către celulele fiice și adesea prin gameți către generațiile viitoare .

Mecanismul molecular precis al amprentării și al altor evenimente epigenetice este încă în discuție, dar se pare că s- a stabilit că metilarea ADN-ului este implicată. În majoritatea organismelor eucariote , grupările metil pot fi adăugate la atomul de carbon din poziția 5 a citozinei (vezi Capitolul 10) ca urmare a *activității* enzimei ADN metiltransferază . Grupările metil sunt adăugate atunci când dinucleotida CpG sau grupuri de CpG (numite două insule CpG) se găsesc de-a lungul catenei de ADN .

Metilarea ADN-ului este un mecanism rezonabil pentru stabilirea unei amprente moleculare , deoarece există dovezi că un nivel ridicat de metilare poate inhiba activitatea genelor și că genele active (sau secvențele lor reglatoare) sunt adesea submetilate. Acest fenomen este un subiect fascinant . Vom găsi exemple suplimentare în text și vom oferi un tratament mai complet al epigeneticii în capitolul special dedicat geneticii moderne (pagina 570) mai târziu în carte .

NETICA, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

Îmbunătățirea destinului genetic al câinilor de rasă pură

Pentru iubitorii de câini, nimic nu este mai sfâșietor decât să vezi un câine orbind încet, în timp ce se luptă să se adapteze la o viață în întuneric total. Asta se întâmplă în cazul atrofiei retiniene progresive (APR), un grup de afecțiuni ereditare descrise pentru prima dată în 1909 la rasa Gordon Setter. De atunci, APR a fost detectată la peste 100 de rase de câini, inclusiv Setterul Irlandez, Border Collie, Elkhound Norvegian, Pudelul Miniatur, Schnauzerul Miniatur, Cocker Spaniel și Husky Siberian.

Dezvoltarea și menținerea unei retine sănătoase necesită produsele multor gene, iar un defect al oricăreia dintre ele poate duce la disfuncții retiniene. Decenii de cercetare au condus la identificarea a cinci astfel de gene *(PDE6A, PDE6B, PRCD, rodopsină* și *PRGR)* și este probabil să fie descoperite și altele. Diferite alele mutante sunt prezente la diferite rase, iar fiecare alelă este asociată cu o formă diferită de PRA, care variază ușor în ceea ce privește simptomele clinice și rata de progresie. Mutațiile din genele *PDE6A, PDE6B și PRCD* sunt moștenite într-un model recesiv, mutațiile din gena *rodopsinei* (cum ar fi cele găsite la mastiffi) sunt dominante, în timp ce mutațiile *PRGR* (la husky siberieni și samoyezi) sunt legate de X.

PRA este de aproape zece ori mai frecventă la anumiți câini de rasă pură decât la rasele mixte. Dezvoltarea diferitelor rase de câini a necesitat o selecție intensă pentru trăsături dezirabile, cum ar fi dimensiunea, forma, culoarea și comportamentul specifice. Multe dintre aceste caracteristici dezirabile sunt determinate de alele recesive. Cea mai rapidă modalitate de a crește homozigoția pentru aceste alele este de a reproduce rude apropiate, care sunt susceptibile de a purta alele identice. De exemplu, câinii pot fi încrucișați cu verii sau bunicii lor. Unii crescători, în încercarea de a profita de pedigree-uri notabile , obțin, de asemenea, sute de urmași de la câini individuali care au câștigat premii în concursuri. Acest „ efect de reproducere populară ", așa cum a fost numit, crește și mai mult homozigoția alelelor la câinii de rasă pură.

Din păcate, generațiile de consangvinitate care au stabilit trăsături favorabile la câinii de rasă pură au crescut și homozigoția anumitor alele recesive dăunătoare , ducând la o incidență ridicată a bolilor ereditare . Peste 300 de tulburări genetice au fost caracterizate la câinii de rasă pură , iar multe dintre aceste rase sunt predispuse la peste 20 dintre ele . Potrivit cercetătorilor de la Universitatea Cornell , câinii de rasă pură suferă de cea mai mare rată de boli ereditare dintre toate animalele: 25 % din cele 20 de milioane de câini de rasă pură din America sunt afectați de una sau mai multe afecțiuni genetice.

Din fericire, progresele în genetica canină încep să ofere noi instrumente pentru îmbunătățirea sănătății câinilor de rasă pură. Până în 2007 , erau disponibile teste genetice pentru a detecta 30 de tipuri diferite de boli retiniene la câini . Astăzi, testele PRA sunt utilizate pentru a identifica purtătorii heterozigoți ai mutațiilor PRCD . *Acești* purtători nu prezintă niciun simptom de PRA, dar dacă sunt încrucișați cu alți purtători , transmit trăsătura la aproximativ 25 % dintre urmașii lor . Eliminarea purtătorilor de PRA din programele de reproducere a eradicat aproape complet această boală la Câinii de Apă Portughezi și a redus considerabil rata de incidență a acesteia la alte rase .

de știință vor putea identifica mai multe gene responsabile pentru tulburările canine ereditare datorită finalizării Proiectului Genomului Canin în 2005. În plus, vor fi dezvoltate noi terapii pentru a corecta defectele genetice .

Proiectul Genomului Canin ar putea fi benefic pentru oameni, pe lângă faptul că ar putea contribui la reducerea incidenței bolilor la tovarășii noștri canini . Acest lucru se datorează faptului că 85 % dintre genele din genomul canin au echivalente la oameni , iar aproape 300 de boli care afectează câinii afectează și oamenii , inclusiv bolile de inimă, epilepsia, alergiile și cancerul. Identificarea unei gene responsabile pentru o boală la câini ar putea fi o scurtătură către izolarea genei corespunzătoare la oameni . Contribuind la vindecarea bolilor umane, câinii ar putea demonstra astfel că sunt „ cel mai bun prieten al omului " într-un mod complet nou.

Rândul tău

I. Acordați-vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile pentru a încerca să înțelegeți unele dintre problemele legate de genetica câinilor de rasă pură.

1. Ați putea enumera câteva dintre limitele - testării genetice , în special în ceea ce privește tulburările genetice la câinii de rasă pură ?

Acest subiect este discutat pe site-ul OptiGen (http://www.optigen.com). OptiGen este o companie care oferă teste genetice pentru toate tipurile cunoscute de PRA la câini și dezvoltă teste pentru alte afecțiuni ereditare. În lista lor TESTE, selectați prcd-PRA și accesați linkul „Beneficii și limitări ale tuturor testelor genetice".

2. Ce boală umană este similară cu PRA la husky-ul siberian ?

Boli moștenite la câini" . (http://server.vet.cam.ac.uk) și căutați în baza de date subiectul Atrofie retiniană progresivă la Husky-ul siberian. Odată ajuns acolo, urmați linkul de referință OMIM pentru mai multe informații despre versiunea umană a PRA la Husky-ul siberian.

3. Recent, unele laboratoare comerciale au clonat câini în scopuri de cercetare și pentru persoanele care doresc să-și recâștige animalul de companie iubit. Sunteți de acord cu clonarea animalelor de companie? De ce sau de ce nu? Credeți că un câine clonat va fi identic cu câinele original?

Pentru a afla despre un caz recent de clonare a câinilor, citiți articolul din Manchester Guardian intitulat „Serviciul de clonare a animalelor de companie naște cinci pui de muci". (http://www.guardian.co.uk/science/2008/aug/05/genetics.korea) .

B. STUDIU DE CAZ Dar el nu este surd

În timp ce își cercetează istoricul familial, un cuplu de persoane surde descoperă că fiecare dintre ei are rude surde de-a lungul mai multor generații. De asemenea, află că o anumită formă de surditate poate fi moștenită ca o trăsătură autosomal recesivă . Își doresc să aibă copii și, pe baza acestor informații, presupun că toți copiii lor vor fi probabil surzi. Spre surprinderea lor, primul lor copil are auz normal. Cuplul vă consultă pe dumneavoastră , un genetician, pentru a vă ajuta să explicați această situație.

1. Este probabil ca acei părinți să fi moștenit surditatea ca o trăsătură autosomal recesivă?
2. Dacă doi părinți surzi au un copil care aude corect , ce concluzii se pot trage despre controlul genetic al surdității ?
3. Este probabil ca un viitor copil să fie surd?

Puntos de resumen

1. De la redescoperirea lucrării lui Mendel, studiul geneticii transmiterii s-a extins pentru a include multe moduri alternative de moștenire, inclusiv studiul dominanței incomplete, codominanței , alelelor multiple și alelelor letale .
2. Raportul F2 clasic al lui Mendel este adesea modificat în cazurile în care variația fenotipică este controlată de interacțiunile genice . Multe astfel de cazuri implică epistazã , în care expresia unei gene influențează sau inhibă expresia alteia .
3. Analiza complementării determină dacă mutațiile care au fost izolate independent și care produc mii de genotipuri sunt alele unele ale altora sau dacă reprezintă gene separate.
4. Pleiotropia se referă la multiplele efecte fenotipice cauzate de o singură mutație.
5. Genele situate pe cromozomul X prezintă un mod caracteristic de transmitere genetică, numit linkage X , care prezintă așa-numitul model de moștenire încrucișată, în care mamele afectate transmit trăsături legate de X tuturor fiilor lor .
6. Moștenirea limitată și influențată de sex apare atunci când sexul organismului afectează fenotipul controlat de o genă situată pe un autosom.
7. Expresia fenotipică nu este întotdeauna o reflectare directă a genotipului. Se poate observa o expresivitate variabilă sau un anumit procent de organisme pot să nu exprime deloc genotipul așteptat, ceea ce stă la baza definirii conceptului de penetranță a unei alele mutante . În plus , fenotipul poate fi modificat de fondul genetic, temperatură și nutriție. În cele din urmă, momentul inițial al expresiei genelor poate varia pe parcursul vieții unui organism , chiar și în funcție de dacă alela mutantă este moștenită de la tată sau de la mamă, ceea ce stă la baza conceptului de amprentare genomică.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

Problemele genetice devin mai complexe atunci când implică două trăsături independente, alele multiple, dominanță incompletă sau epistază. Cele mai dificile tipuri de probleme sunt cele cu care se confruntă geneticienii pionieri în laborator sau în studii de teren. Aceștia au trebuit să determine modul de moștenire lucrând înapoi, de la observarea urmașilor până la părinții cu genotip necunoscut.

1. Luați în considerare problema moștenirii formei fagurelui la pui, unde s-au observat diferite fenotipuri: faguri de nuc, faguri de mazăre, faguri de trandafir și faguri simpli. Aceste variante sunt prezentate în fotografiile însoțitoare. Folosind următoarele date, determinați cum este moștenită forma fagurelui și ce genotipuri sunt prezente în generația Pt a fiecărei încrucișări.

Trecerea 1·	simplu	X	simplu	—>	totul simplu
Trecerea	piuliță	X	piuliță	—»	toată nuca
Trecerea	rozetă	X	mazăre	—*	toată nuca
Trecerea		F, X	F, de la		
	piuliță	X	piuliță	—♦	93 nuc 28 rozetă 32 de mazăre, 10 simple

Soluție. La prima vedere, această problemă poate părea foarte dificilă. Cu toate acestea, prin aplicarea unei abordări sistematice și împărțirea analizei într-o serie de pași, o putem simplifica. Pentru început, analizați cu atenție datele pentru orice informații utile. După ce ați identificat ceva în mod clar util, urmați metoda empirică; adică, formulați o ipoteză și testați-o în raport cu datele furnizate. Căutați un model de moștenire care să fie consistent în toate cazurile.

Această problemă ne oferă imediat două informații utile . În primul rând, în încrucișarea 1, indivizii P produc urmași identici cu ei înșiși. În al doilea rând, deși indivizii P cu faguri în formă de nucă produc urmași identici în încrucișarea 2, un fenotip de nucă se obține și în încrucișarea 3 între rozetă și mazăre. Când aceste nuci F1 sunt împerecheate în încrucișarea 4, toate cele patru forme de faguri sunt generate într-un raport care se aproximează de 9 :3:3:1. Acest lucru sugerează imediat o încrucișare care implică două perechi de gene, deoarece datele rezultate urmează același raport ca în încrucișările dihibride mendeliene. Deoarece este o singură trăsătură (formă de fagure), este posibil să producă un fel de epistază. Aceasta ar putea servi ca ipoteză de lucru , iar ceea ce va trebui să facem acum este să propunem cum interacționează cele două perechi de gene pentru a da naștere fiecărui fenotip.

Dacă numim perechile de alele A, *a* și *B, b,* am putea prezice că, deoarece fenotipul de nuc reprezintă 9/16 din urmașii din încrucișarea 4, *AB-* va rezulta într-o nucă. (Rețineți că A- și B- *înseamnă* AA *sau Aa și respectiv BB sau Bb* .) De asemenea, s-ar putea emite ipoteza că în încrucișarea 2 genotipurile sunt *AABB* X *AABB,* tipul de nucă fiind transmis urmașilor .

Fenotipul care reprezintă 1/16 din urmașii din încrucișarea 4 este cu o singură creastă; prin urmare, putem prezice că fenotipul cu o singură creastă este rezultatul *genotipului aabb.* Acest lucru este în concordanță cu încrucișarea 1.

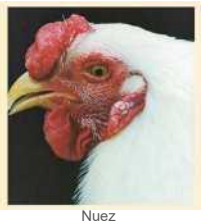
Acum trebuie doar să determinăm genotipurile pentru fagurii de trandafir și fagurii de mazăre. Cea mai logică predicție este că aceste fenotipuri pot fi explicate prin cel puțin o alelă dominantă A sau *B,* combinată cu condiția dublu recesivă a celeilalte perechi de alele. De exemplu,

A—bb	—*	rozetă
aa B-	—*	mazăre

În încrucișarea 3, dacă *AAbb* (rozetă) ar fi încrucișat cu *aaBB* (mazăre), toți urmașii ar fi *AaBb* (nuc). Acest lucru este în concordanță cu datele și acum trebuie doar să examinăm încrucișarea.

4. Prevedem că acele genotipuri de nuc vor fi *AaBb* (ca înainte), iar din încrucișare

AaBb (nucă) X *AaBb* (nucă)


Nuez

Guisante

Roseta

Sencilla

sperăm

9/16 *AB*- (nucă)
3/16 A -*bb* (rozetă)
3/16 *aaB*- (mazăre)
1/16 *aabb* (single)

Predicția noastră este în concordanță cu datele . Ipoteza inițială a - interacțiunii dintre două perechi de gene s-a dovedit a fi complet consistentă, iar problema este rezolvată.

Acest exemplu demonstrează necesitatea de a înțelege baza teoretică a geneticii ereditare . Înarmați cu aceste cunoștințe , putem căuta indicii care ne permit să avansăm pas cu pas către soluție . Stăpânirea deplină a tehnicilor de rezolvare a problemelor necesită multă practică, dar poate fi și foarte recompensatoare. Aplicați aceeași abordare generală următoarelor probleme.

2. La ridichi, culoarea florilor poate fi roșie, violet sau albă . Partea comestibilă a ridichii poate fi alungită sau ovală. Când se studiază doar culoarea florilor, nu există dovezi de dominanță, iar încrucișarea roșului cu alb are ca rezultat flori violete . Dacă aceste flori violete (Fj) sunt încrucișate, generația F2 este compusă din 1/4 roșii, 1/2 violete și 1/4 albe. În ceea ce privește forma ridichii, cea alungită este dominantă față de cea ovală, într-o manieră mendeliană normală.

(a)Determinați fenotipurile F1 și F2 ale unei încrucișări între o ridiche alungită, non-roșie, și o ridiche albă, ovală, ambele de rasă pură. Asigurați-vă că definiți toate simbolurile genetice de la început.

(b) O plantă ovală, roșie, este încrucișată cu o plantă cu genotip și fenotip necunoscute, rezultând următorii urmași :

103 roșu lung: 101 roșu oval
98 violet lung: 100 violet oval

Determinați genotipul și fenotipul plantei necunoscute.

Soluție. Mai întâi, să stabilim simbolurile pentru gene:

RR	—	roșu	*O~*	—	alungit
Rr	=	violet	*oo*	=	oval
rr	=	alb			

(a)Aceasta este o încrucișare dihibridă modificată, în care perechea de gene care controlează culoarea prezintă o dominanță incompletă. Forma este controlată în mod convențional.

P,: *RROO* X *rroo*
(roșu alungit) (alb oval)
F,: toate *RrOo* (violet alungit)
F, X Ff *RrOo* X *RrOo* roșu alungit roșu oval violet alungit violet oval alb alungit alb oval

Deoarece planta ovală trebuie să fie oo , planta necunoscută trebuie să aibă genotipul *Oo* pentru a produce aceste rezultate. Prin urmare,

1/4 *RR*	^^3/A O-	3/16 RR O-
	-1 /4 oo	1/16 *RRoo*
F2 2/4 *Rr*	O-	*6/16 Rr O-*
	"""—1/4 oo	2/16 *Rroo*
ÌArr	—— o-	3/16 *rrO-*
	"""■'•1/4 oo	1/16 *rroo*

Rețineți că, pentru a obține rezultatele F2 de mai sus , am folosit metoda diagramei de ramificare . Mai întâi, am considerat rezultatul încrucișării părinților p! pentru genele de culoare (Rr x Rr). Apoi, am obținut rezultatul corespunzător pentru formă (Oo x Oo) .

(b) Cele două trăsături par a fi moștenite independent , așa că le vom lua în considerare separat. Datele indică un raport de 1/4 : 1/4 :1/4: 1/4. Mai întâi, să luăm în considerare culoarea :

P,: X roșu ¿? (necunoscut)
F,: 204 roșu (1/2)
198 violet (1/2)

Deoarece planta -mamă roșie trebuie să fie RR, planta necunoscută trebuie să aibă un genotip Rr pentru a obține aceste rezultate . Prin urmare, trebuie să fie violetă. Să luăm acum în considerare forma :

P (: oval X ¿? (necunoscut)
Fp 201 lung (1/2)
201 ovale (1/2)

Soluție. Pentru ambele genealogii, moștenirea recesivă legată de X și cea autozomal recesivă rămân posibile, presupunând că părintele matern este heterozigot în pedigree-ul (b). Dominanța autozomală pare puțin probabilă la prima vedere în pedigree-ul (a), deoarece cel puțin jumătate dintre urmași ar trebui să exprime o trăsătură dominantă moștenită de la unul dintre părinții lor . Cu toate acestea, deși este adevărat că, dacă părintele afectat este heterozigot pentru o genă autozomal dominantă , fiecare urmaș are o șansă de 50% de a moșteni și exprima gena mutantă, dimensiunea eșantionului de doar patru urmași este prea mică pentru a exclude această posibilitate. În pedigree-ul (b), dominanța autozomală este în mod clar posibilă. În ambele cazuri , dominanța legată de X poate fi exclusă deoarece urmașii de sex feminin ar moșteni și ar exprima alela dominantă și nu exprimă această trăsătură în niciunul dintre pedigree-uri .

trebuie să fie alungită. Planta necunoscută este, prin urmare,

RrOo lung violet

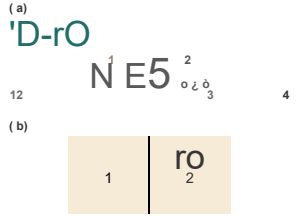
3. La oameni, daltonismul roșu-verde este moștenit ca o trăsătură recesivă legată de cromozomul X. O femeie cu vedere normală, al cărei tată era daltonist, se căsătorește cu un bărbat cu vedere normală. Preziceți vederea culorilor urmașilor lor de sex masculin și feminin .

Soluție. Femeia este heterozigotă, moștenind un cromozom X de la tatăl ei cu alela mutantă. Soțul ei este normal. Prin urmare, genotipurile paterne sunt:

CE X Cf ((reprezintă cromozomul Y)

Toate urmașii de sex feminin vor fi normali (CC sau Cc). Jumătate dintre copiii de sex masculin vor fi daltoniști (c[), iar cealaltă jumătate va avea vedere normală (Cf).

4. Luați în considerare cele două genealogii foarte limitate prezentate mai jos, care nu sunt înrudite între ele. Dintre cele patru combinații posibile: recesiv legat de X, dominant legat de X, autosomal recesiv și autosomal dominant, care moduri de moștenire pot fi excluse absolut în fiecare caz?



DE CUM ȘTIM >

Problemas y preguntas para la discusión

1. În acest capitol, ne-am concentrat pe extinderile și modificările principiilor și proporțiilor mendeliene. În acest proces, am întâlnit numeroase ocazii de a ne întreba cum au fost obținute aceste informații. Având în vedere explicațiile oferite în text , ce răspunsuri ați propune la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum au reușit geneticienii timpurii să descopere modele de moștenire care nu se încadrau în raporturile mendeliene tipice?
   (b) Cum au stabilit geneticienii că moștenirea unor caracteristici fenotipice implică interacțiunea a două sau mai multe perechi de gene ? Cum au reușit să determine câte perechi de gene erau implicate?
   (c) De unde știm că anumite gene specifice sunt situate pe cromozomii care determină sexul, și nu pe autozomi ?
   (d) Pentru genele a căror expresie pare să fie legată de sexul indivizilor , cum știm dacă o genă este legată de X, mai degrabă decât să prezinte doar un mod de moștenire limitat sau influențat de sex ?

2. La bovinele cu coarne scurte, culoarea blănii poate fi roșie, albă sau brună. Brunul este un fenotip intermediar, cu un amestec de fire de păr roșii și albe. Următoarele date au fost obținute din mai multe încrucișări :

roșu	X	roșu	—►	tot roșu
alb	X	alb	—*	tot alb
roșu	X	alb	—►	toți măcălenii
mătăsos	X	mătăsos	—»	1/4 roșu: 1/2 mărunțit: 1/4 alb

   Cum se moștenește culoarea blănii? Care sunt genotipurile părinților și ale urmașilor lor în fiecare încrucișare?
3. Comparați dominanța incompletă și codominanța . Definiți fenomenul de epistază în contextul conceptului de interacțiune genică .
4. La vulpi, două alele ale aceleiași gene, *P* și *p*, Acestea pot duce la letalitate *(PP),* blană platinată *(Pp)* sau blană argintie *(pp).* Ce rapoarte se vor obține atunci când se încrucișează vulpi cu blană platinată ? Se comportă alela *P* ca dominantă sau recesivă în ceea ce privește (a) letalitatea și (b) blana platinată?
5. Un mutant cu coadă scurtă a fost descoperit la șoareci . Când a fost încrucișat cu un șoarece normal cu coadă lungă, s-au obținut 4 urmași cu coadă scurtă și 3 cu coadă lungă . Doi șoareci cu coadă scurtă din generația Fj au fost selectați și încrucișați. Aceștia au produs 6 șoareci cu coadă scurtă și 3 cu coadă lungă . Aceste experimente genetice au fost repetate de trei ori, cu aproximativ aceleași rezultate. Ce tipuri de raporturi genetice reprezintă acestea un exemplu? Propuneți o ipoteză despre modul de moștenire și desenați o diagramă a încrucișărilor.
6. Enumerați toate genotipurile posibile pentru fenotipurile A, B, AB și O. Este modelul de moștenire a grupei sanguine ABO reprezentativ pentru dominanță, recesivitate sau codominanță?
7. În ceea ce privește grupa sanguină ABO la om, determinați genotipurile următoarei perechi:

   Masculin: grupa sanguină B; mamă grupa sanguină 0; femeie: grupa sanguină A; tată grupa sanguină B.

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

   Preziceți grupele sanguine ale urmașilor pe care le-ar putea avea acest cuplu și proporțiile așteptate ale fiecăreia dintre ele.
8. Într -un litigiu de paternitate , copilul are grupa sanguină 0, în timp ce mama are grupa sanguină A. Ce grupă sanguină ar exclude un bărbat din categoria tatălui copilului ? Ar dovedi alte grupe sanguine că un anumit bărbat este tatăl?
9. La om, antigenele A și B pot fi găsite, în forma lor solubilă în apă , în secreții precum saliva, la unele persoane *(Se/Se* și *Se/se)* , dar nu și în altele *(se/se). Prin urmare,* populația conține atât „secretori", cât și „non-secretori".

   MG

   (a) Determinați proporția diferitelor fenotipuri (grupa sanguină și capacitatea de secreție) în încrucișările dintre indivizi care au grupa sanguină AB și O, și în care ambele sunt *Se/se.*
   (b) Cum s-ar schimba rezultatele unor astfel de încrucișări dacă ambii părinți ar fi heterozigoți pentru gena care controlează sinteza substanței H (H/i)?
10. La găini, există o afecțiune numită *„creeper" (găini târâtoare),* în care pasărea are picioare și aripi foarte scurte și pare să se târască atunci când merge. Dacă găinile *târâtoare* sunt încrucișate cu găini normale, jumătate dintre urmași vor fi normali, iar cealaltă jumătate va fi târâtoare . Târâtorul Nu sunt niciodată de rasă pură. Dacă sunt încrucișate , două treimi sunt găini de tip târâtor , iar *o* treime sunt găini normale. Propuneți o explicație pentru modul de moștenire a acestei afecțiuni.
11. La iepuri , o serie de alele multiple controlează culoarea blănii după cum urmează: C este dominantă asupra tuturor celorlalte alele și are ca rezultat o culoare normală. Fenotipul de chinchilla se datorează alelei care este dominantă asupra tuturor celorlalte alele, cu excepția C. Alela c * este dominantă doar asupra c (albinos) și are ca rezultat o culoare a blănii himalayană. Prin urmare, ordinea dominanței este C > c1 ˚> *c* > c1*. Pentru fiecare dintre următoarele trei cazuri , sunt prezentate fenotipurile generației F1 din două încrucișări , precum și fenotipul unui *membru al* generației F1 .

	Fenotipuri P,		Fenotipuri F (
	Himalaya X Himalaya (a)		albinos X -»??
	culoare normală X albino	—*	chinchilla
(b)	chinchilla albinoasă X	—*	albinos X -»??
	culoare normală X albino	— »	culoare normală
(c)	chinchilla X albino	—*	Himalaya X -»??
	culoare normală X albino	— »	Himalaya

   Pentru fiecare caz, determinați genotipurile generației Pj și urmașii p! și preziceți rezultatele care s-ar obține prin efectuarea fiecăreia dintre încrucișările indicate între indivizii lui F!.
12. Trei perechi de gene situate pe autozomi diferiți determină culoarea și forma florii , precum și înălțimea plantei. Prima pereche prezintă o dominanță incompletă, rezultând o culoare a florii roșie, roz (heterozigoți) sau albă. A doua pereche determină forma florii : personată (dominanta) sau pelorică (recesivă). A treia pereche determină tulpini înalte (dominante) sau tulpini pitice (recesive). Plantele homozigote roșii, personate și înalte

sunt încrucișate cu plante albe, pelorice și pitice. Determinați genotipurile și fenotipurile plantelor F_1 și F_2. Dacă plantele F_1 sunt încrucișate între ele, ce proporție din urmași va prezenta același fenotip ca și plantele F_2?

personada pelórica

13. Ca și în problema 12, culoarea poate fi roșie, albă sau roz, iar forma personată sau pelorică. În următoarele încrucișări, determinați - genotipurile F1 și F2.

(a) roșu, alb X păros , personaj
4
Toate trandafirii personalizați

(b) roșu, persona X alb, pelic

F,: toate trandafirii personalizați

1/4 roșu, personada 1/4 roșu, pelic 1/4 roz, pelic 1/4 roz, personada

(c) rosa, personada X roja pelórica —*■ F, 1/4 alb, personaj 1/4 alb, pelic 1/4 roz, personaj 1/4 roz, pelic

(d) rosa, personada X blanca, pelórica —» F, (e) Ce raporturi fenotipice ar apărea în încrucișarea dintre F1 din (a) și F2 (din (b)?

14. Caii pot fi cremello (culoare crem deschis), castaniu (culoare alună) sau palomino (culoare aurie cu coamă și coadă albe). Dintre aceste fenotipuri, palomino nu este niciodată de rasă pură.

cremello X palomino —*. 1/2 cremello, 1/2 palomino, 1/2 castan X palomino —»1/2 palomino, 1/4 castan, 1/2 palomino, palomino 1/4 cremello

(a) Din rezultatele prezentate în coloanele anterioare , determinați modul de moștenire , atribuind simboluri genetice și indicând ce genotipuri produc ce fenotipuri.

(b) Preziceți rezultatele F1 și F2 ale multor încrucișări între cai cremello și cai castani.

15. În ceea ce privește fenotipurile de culoare a ochilor produse de loci recesivi autozomali, nelegați , *maro* și *stacojiu* la *Drosophila (vezi* Figura

Castaño

Palomino

Cremello

4.10), preziceți rezultatele pentru F1 și F2 ale următoarelor încrucișări P1 (. (Reamintim că atunci când ambele alele , *maro* și *stacojiu,* sunt homozigote, nu se produce pigment și ochii sunt albi.)

(a) tipul sălbatic X alb
(b) de tip sălbatic X
(c) maro X alb

16. Pigmentul de blană la șoareci este produs numai atunci când este prezentă alela *C*. Indivizii cu genotipul *cc* sunt albi . Dacă este prezentă culoarea, aceasta poate fi determinată de alelele *Aya* . *AA* sau *Aa au* ca rezultat o culoare agouti, în timp ce *aa* rezultă o blană neagră.

(a) Ce raporturi fenotipice și genotipice vor fi obținute la F) și F, când șoarecii *AACC* și *aacc** sunt încrucișați ?

(b) În trei încrucișări între agouti femele cu genotip necunoscut și masculi cu genotip *aacc,* s-au obținut următoarele proporții fenotipice :

(1) 8 agouti, 8 albe
(2) 9 agouti, 10 bărbați de culoare
(3) 4 agouti, 5 negri, 10 albe

Care sunt genotipurile părinților materni?

17. La șobolani, următoarele genotipuri a două gene autozomale moștenite independent determină culoarea blănii:

AB-	(gri)
A-bb	(galben)
aaB-	(negru)
aabb	(cremă)

O a treia pereche de gene , situată pe un autosom diferit , determină dacă va fi produsă sau nu o anumită culoare . Genotipurile CC și *Cc* Acestea permit colorarea, în funcție de exprimarea alelelor *A și B.* Totuși , genotipul *cc* Dă naștere la șobolani albinoși, indiferent de prezența alelelor A și *B.* Determinați raportul fenotipic al F1 pentru următoarele încrucișări:

(a) *AAbbCC* X *aaBBcc*
(b) *AaBBCC* X *AABbcc*
(c) *AaBbCc* X *AaBbcc*
(W) *AaBBCc* X *AaBBCc*
(e) *AABbCc* X *AABbcc*

18. Având în vedere modelul de moștenire a culorii blănii la șobolani, așa cum este descris în Problema 17 , preziceți genotipurile și fenotipurile părinților care dau naștere următorilor urmași:
    (a) 9/16 gri: 3/16 galben: 3/16 negru: 1/16 crem
    (b) 9/16 gri: 3/16 galben: 4/16 albino
    (c) 27/64 gri: 16/64 albino: 9/64 galben: 9/64 negru: 3/64 crem
    (d) 3/8 negru: 3/8 crem: 2/8 albino
    (e) 3/8 negru: 4/8 albino: 1/8 crem
19. La o specie din familia felinelor, culoarea ochilor poate fi gri, albastru, verde sau maro, iar fiecare trăsătură se comportă ca și cum ar fi o rasă pură. În diferite încrucișări între părinți homozigoți, s-au obținut următoarele rezultate :

Trecere	P.	F,	F>
LA	verde X gri	tot verde	3/4 verde: 1/4 gri
B.	verde X maro	tot verde	3 4/ verde : 1/4 maro
C.	gri X maro	tot verde	9/16 verde: 3/16 maro
			3/16 gri: 1/16 albastru

    (a) Analizați datele. Câte gene sunt implicate? Definiți simbolurile genelor și indicați ce genotipuri produc fiecare fenotip.
    (b) Într -o încrucișare între o pisică cu ochi gri și o alta cu genotip și fenotip necunoscute, generația F1 nu a fost observată. Cu toate acestea, rezultatele F2 au dat aceeași proporție F2 ca în încrucișarea C. Determinați genotipurile și fenotipurile pisicilor necunoscute din p1 și F2 .
20. Într -o plantă, o varietate înaltă este încrucișată cu o varietate pitică . Toate plantele Fj erau înalte. Când plantele F1 x F2 au fost încrucișate . 9/16 din plantele F2... Erau înalți și 7/16 erau pitici.
    (a) Explicați moștenirea înălțimii, precizând numărul de perechi de gene implicate și care genotipuri duc la plante înalte și care la plante pitice (folosiți liniuțe acolo unde este cazul).
    (b) F2 sunt autofecundate , ce proporție vor fi de rasă pură ? Indicați genotipurile.
21. La o anumită specie de plante, florile pot fi galbene, albastre, roșii sau mov. Toate culorile pot fi de rasă pură. Dacă plantele cu flori albastre sunt încrucișate cu plante cu flori roșii, toate plantele F2 vor avea flori galbene. Când acestea produc o generație F2 , se obțin următoarele rezultate:

    9/16 galben: 3/16 albastru: 3/16 roșu: 1/16 mov

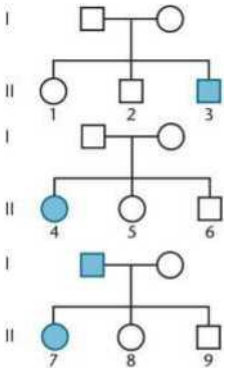
    Într-o altă încrucișare, folosind plante de rasă pură ca părinți, plante cu flori galbene au fost încrucișate cu plante cu flori mov. Din nou , toate plantele F2 au avut flori galbene , iar în generația F2 a apărut un raport de 9:3:3: 1 , similar cu cel precedent.
    (a) Descrieți moștenirea culorii florilor , definind simbolurile genelor și desemnând genotipurile care duc la fiecare dintre cele patru fenotipuri.
    (b) Determinați rezultatele F1 și F2 ale unei încrucișări între plante de rasă pură cu flori roșii și plante cu flori mov .
22. Următorul tabel prezintă cinci încrucișări la specia umană (1-5), inclusiv fenotipurile materne și paterne pentru antigenele grupei sanguine ABO și MN.
    Fiecare încrucișare are ca rezultat unul dintre cele cinci grupuri de urmași arătați în coloana din dreapta (ae). Asociați urmașii cu părinții corecți, folosind fiecare pereche de părinți o singură dată. Există mai mult de un grup de răspunsuri corecte?

Fenotipos paternos				Descendientes	
(1)	A, M	X	A, N	(a)	A, N
(2)	B, M	X	B, M	(b)	O, N
(3)	O, N	X	B, N	(c)	O, MN
(4)	AB, M	X	O, N	(d)	B, M
(5)	AB, MN	X	AB, MN	(e)	B, MN

23. Un cuplu căsătorit are vedere normală, deși tatăl fiecărui soț are daltonism roșu-verde , care este moștenită ca o trăsătură recesivă legată de cromozomul X. Care este probabilitatea ca primul lor copil să fie (a) un băiat cu vedere normală, (b) o fată cu vedere normală, (c) un băiat cu daltonism, (d) o fată cu daltonism?
24. La oameni, grupa sanguină ABO este controlată de mai multe alele autozomale. Daltonismul este o trăsătură recesivă legată de cromozom X. Dacă doi părinți, ambii de grupa sanguină A și cu vedere normală, au un copil care este de grupa sanguină O și daltonist , care este probabilitatea ca următorul lor copil să fie o fată cu vedere normală și grupa sanguină O?
25. La *Drosophila,* mutația recesivă legată de cromozomul X, *festonată (sd),* are ca rezultat margini neregulate ale aripilor. Schițați rezultatele în F1 și F2. Dacă (a) o femelă cu gena *scoarpată* este încrucișată cu un mascul normal; (b) un mascul *scoarpată* cu o femelă normală. Comparați aceste rezultate cu cele care s-ar obține dacă *gena scoarpată* nu ar fi legată de cromozomul X.
26. O altă mutație recesivă la *Drosophila, ebony* (e), este localizată pe un autosom (pe cromozomul 3) și are ca rezultat un corp mai închis la culoare decât la musculițele de tip sălbatic. Care sunt raporturile fenotipice tipice în F1 și F2? Care va fi urmașii (F) ai femelelor și masculilor dacă o femelă cu aripi *festonate* și corp de culoare normală este încrucișată cu un mascul *de culoarea negrului* cu aripi normale? Rezolvați această problemă atât prin metoda pătratului Punnett, cât și prin metoda diagramei de ramificare.
27. La *Drosophila,* mutația recesivă legată de X, *vermilion* (v) are ca rezultat ochi roșii strălucitori, spre deosebire de ochii roșii de tip sălbatic. O mutație autozomal recesivă distinctă, *supresoare a vermilionului (su-v),* are ca rezultat musculițe homozigote sau hemizigote pentru *v cu ochi de* tip sălbatic . În absența alelei vermilion , *su-v* nu are niciun efect asupra culorii ochilor . Determinați raporturile fenotipice tipice la Fj și F, din încrucișări între femele cu alele de tip sălbatic la *locusul vermilion,* dar homozigote pentru *su-v,* cu un mascul *vermilion* care are alelele de tip sălbatic la locusul su-v.
28. În timp ce *vermilionul este o* culoare a ochilor roșu aprins legată de cromozomul X , *marou*l este o mutație autozomal recesivă care închide culoarea ochilor. Mușteleare poartă ambele mutații pierd tot pigmentul și au ochii albi. Preziceți rezultatele în F1 și F2. dintre următoarele intersecții:
    (a) Femele *vermilion* x masculi maronii .
    (b) Femele *brune* X masculi vermilion .
    (c) Femele albe X masculi de tip sălbatic.
29. Într-o încrucișare *cu Drosophila* care implică mutația recesivă legată de cromozomul X , *gena albă* , și o mutație autozomal recesivă sepia (*care duce* la înnegrirea ochilor), preziceți rezultatele în F1 și F2 la încrucișarea părinților de rasă pură cu următoarele fenotipuri:

(a) femele albe x masculi sepia;
(b) femelă de sepie X masculi albi.
Rețineți că *albul* este epistatic în ceea ce privește expresia sepiei.

30. Luați în considerare următoarele trei genealogii pentru o trăsătură specifică speciei umane:



(a) Ce afecțiuni pot fi excluse? Dominante legate de cromozom X și autosomal dominante
recesiv și legat de X recesiv și autosomal
(b) Pentru orice afecțiuni excluse , indicați ce individ din Generația a II-a (de exemplu, II-1, II-2) v -a influențat decizia de a exclude acea afecțiune. Dacă niciuna nu este exclusă, răspundeți „nu se aplică".
(c) Având în vedere *concluziile* dumneavoastră, indicați genotipul dintre următoarele persoane :

II-1; II-6; II-9

Dacă există mai multe posibilități, indicați-le. Folosiți simbolurile A și *a* pentru genotipuri.

31. La capre , dezvoltarea bărbii se datorează unei gene recesive . Să presupunem că efectuăm următoarea încrucișare cu capre de rasă pură și o ducem până la generația F2 :

P,: femeie cu barbă X bărbat fără barbă

F,: toți bărbații cu barbă și femeile fără barbă

P x P » 1/8 masculi fără barbă
3/8 masculi cu barbă
3/8 femele fără barbă
1/8 femele cu barbă

Oferiți o explicație pentru moștenirea și exprimarea acestei trăsături , inclusiv o diagramă a încrucișării. Propuneți una sau mai multe încrucișări care v-ar permite să vă testați ipoteza.

32. Preziceți rezultatele F1 și F2 la încrucișarea unui cocoș cu pene de cocoș cu o găină de rasă pură cu pene de găină . Rețineți că aceste trăsături sunt limitate de sex .
33. Două mame și -au născut copiii în același timp , într-un spital urban aglomerat. Copilul cuplului 1 are hemofilie, o boală cauzată de o alelă recesivă legată de cromozomul X. Niciunul dintre părinți nu are boala. Cuplul 2 are un copil normal, chiar dacă tatăl este hemofil. Câțiva ani mai târziu, Cuplul 1 a dat în judecată spitalul , susținând că cei doi nou-născuți au fost schimbați după naștere. Ești chemat, în calitate de consilier genetic, să depui mărturie . Ce informații ai oferi juriului cu privire la această acuzație?
34. Discutați subiectul expresiei fenotipice și numerosii factori care o - afectează.
35. Comparați penetrarea și expresivitatea ca termeni legați de exprimarea fenotipică.

Problemas extrapicantes

Para ver los problemas y tutoriales asignados por el profesor, consulte www.masteringgenetics.com

36. Labrador Retriever-ii pot fi negri, maro (ciocolatiu) sau aurii (galben). Deși fiecare culoare poate fi de rasă pură, se pot obține rezultate foarte diferite examinând mai multe pui dintr -o serie de încrucișări în care părinții nu sunt neapărat de rasă pură. Câteva dintre numeroasele posibilități sunt prezentate mai jos .

Propuneți un mod de moștenire care să fie în concordanță cu aceste date și indicați genotipurile corespunzătoare ale părinților din fiecare

(a)	negro	X	marrón		todos negros
(b)	negro	X	marrón		1/2 negros 1/2 marrones 3/4
(c)	negro	X	marrón		negros 1/4 dorados todos
(d)	negro	X	dorado		negros 4/8
(e)	negro	X	dorado		dorados 3/8 negros 1/8 marrones
(f)	negro	X	dorado	—*	2/4 dorados 1/4 negros 1/4 marrones
(g)	marrón	X	marrón	—»	3/4 marrones 1/4 dorados
(h)	negro	X	negro	—»	9/16 negros 4/16 dorados 3/16 marrones

încrucișare. De asemenea, indicați genotipurile câinilor de rasă pură pentru fiecare culoare.

plantă pură cu frunze violet , izolată dintr -o zonă a pădurii tropicale din Puerto Rico (El Yunque), a fost încrucișată cu o varietate pură cu frunze albe dintr-o zonă opusă

a pădurii tropicale. Descendenții F1 aveau toți frunze pur violet . Un număr mare de încrucișări F1 x F2 au dat următoarele rezultate:

Mov: 4.219 Alb: 5.781 (Total = 10.000)

Propuneți o explicație pentru moștenirea culorii frunzelor. Ca genetician, cum v-ați testa ipoteza? Descrieți experimentele pe care le-ați efectua.

38. bovinele Dexter și Kerry , animalele pot fi fără coarne sau cu coarne. Animalele Dexter au picioare scurte, în timp ce animalele Kerry au picioare lungi. Când s-au obținut mulți urmași din încrucișări între bovine Kerry fără coarne și bovine Dexter cu coarne, jumătate au fost Dexter fără coarne, iar cealaltă jumătate au fost Kerry cu coarne . Când indivizii Fp au fost încrucișați, s-au obținut următoarele date:

3/8 Dexter mochos
3/8 Kerry trunchiat
Dexter la scara 1/8 cu coarne
Scara 1/8 cu coarne Kerry

Un genetician a fost nedumerit de aceste date și a intervievat fermierii care crescuseră aceste vite timp de decenii. El a aflat că familia Kerry era de rasă pură. Pe de altă parte, familia Dexter nu era de rasă pură și nu a avut niciodată la fel de mulți urmași ca familia Kerry. Propuneți o explicație genetică pentru aceste observații.

39. Un genetician extraterestru, de pe o planetă unde cercetarea genetică era interzisă, a adus pe Pământ două linii de broaște domestice de rasă pură. O linie orăcăia cu un sunet de tip *„rib-it rib-it"* și avea ochi violet. Cealaltă linie orăcăia mai încet, murmurând *„ni-dip ni-dip"* și avea ochi verzi. Cu noua sa libertate de cercetare, a încrucișat cele două tipuri de broaște. În F1 Toate broaștele aveau ochi albaștri și *croncăneau.* A continuat să facă multe încrucișări F2 și, când a analizat complet datele F2 , și-a dat seama că acestea puteau fi reduse la următoarele proporții :

27/64 cu ochi albaștri și *croncănit*
12/64 cu ochi verzi și *croncănit*
9/64 cu ochi albaștri și un murmur *ni-dip*
9/64 cu ochi mov și *croncănit răzând*
4/64 cu ochi verzi și un murmur *ni-dip*
3/64 cu ochi violet și murmur *ni-dip*

(a) Câte perechi de gene sunt implicate în moștenirea ambelor trăsături? Explicați răspunsul.
(b) culoarea ochilor ? Cum poți spune asta? Câți controlează orăcăitul ?
(c) Atribuiți simboluri tuturor fenotipurilor și indicați genotipurile - broaștelor din P și F1 .
(d) Precizați genotipurile celor șase fenotipuri F2 .
(e) După ani de experimente, geneticianul a izolat tulpini de rasă pură pentru cele șase fenotipuri F2 . Indicați raporturile fenotipice dintre F1 și F2. dintre următoarele încrucișări în care se utilizează aceste tulpini de rasă pură :

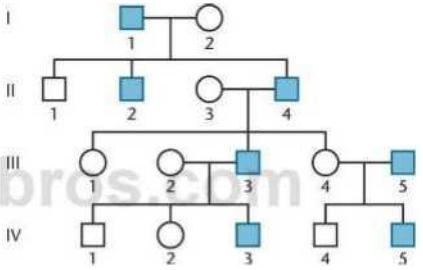
cu ochi albaștri, murmură *ni-dip* cu ochi violet, croncănește *rib-it*

(f) O serie de încrucișări cu liniile sale de rasă pură a cauzat inițial o oarecare confuzie geneticianului. Când a încrucișat un exemplar de rasă pură cu ochi violet și *un murmur ni-dip* cu un alt exemplar de rasă pură cu ochi verzi și un murmur ni-dip , El a obținut adesea rezultate diferite . În unele încrucișări, toți urmașii aveau ochi albaștri și un *murmur ni-dip,* dar în alte încrucișări, toți urmașii aveau ochi violet și un *murmur ni-dip. Într-un al treilea tip de încrucișare,* s-au observat urmași cu ochi albaștri și un murmur *ni-dip* , precum și cei cu ochi violet și un *murmur ni-dip.* Explicați de ce rezultatele au diferit.
(g) Într-un alt experiment, geneticianul a încrucișat două broaște cu ochi mov și *orăcăit,* rezultatele fiind prezentate mai jos .

9/16 cu ochi mov și *croncănit răzând*
3/16 cu ochi violet și murmur *ni-dip*
3/16 cu ochi verzi și *croncănit*
Scară 1/16 cu ochi verzi și un murmur *ni-dip*

Care au fost genotipurile celor doi părinți?

40. Următorul pedigree este caracteristic unei trăsături ereditare cunoscute sub numele de pubertate precoce masculină, în care bărbații afectați prezintă semne de pubertate până la vârsta de 4 ani. Propuneți o explicație genetică pentru acest fenotip.



libros.com

41. Într-un examen de genetică, studenților li s-a cerut să răspundă la următoarea întrebare prin convertirea datelor într -un „raport semnificativ" și apoi rezolvarea problemei. Profesorul a presupus că raportul final ar reflecta două perechi de gene, iar majoritatea răspunsurilor corecte s-au potrivit acestei predicții . Iată întrebarea de examen .

„ Florile pot fi albe, portocalii sau maro. Când plantele cu flori albe sunt încrucișate cu plante cu flori maro , toate plantele din generația F1 au avut flori albe . Următoarele date au fost obținute pentru florile F2 : "

48 alb
1 2 portocale
4 maronii

Conversia datelor F2 în proporții semnificative care să permită explicarea moștenirii culorii. Determinați numărul de gene implicate și genotipurile responsabile pentru fiecare fenotip."
(a) Rezolvați problema pentru două perechi de gene. Care este raportul în generația F2 ?
(b) Unii studenți nu au reușit să reducă raportul și au rezolvat - problema folosind trei perechi de gene. Examinată cu atenție, soluția lor a fost considerată un răspuns valid. Rezolvați problema folosind trei perechi de gene.
(c) Acum avem o dilemă. Datele sunt compatibile cu două mecanisme alternative de moștenire . Propuneți un experiment de încrucișare cu părinții originali care vă va permite să distingeți

între cele două soluții propuse de studenți. Explicați cum ar rezolva acest experiment dilema.

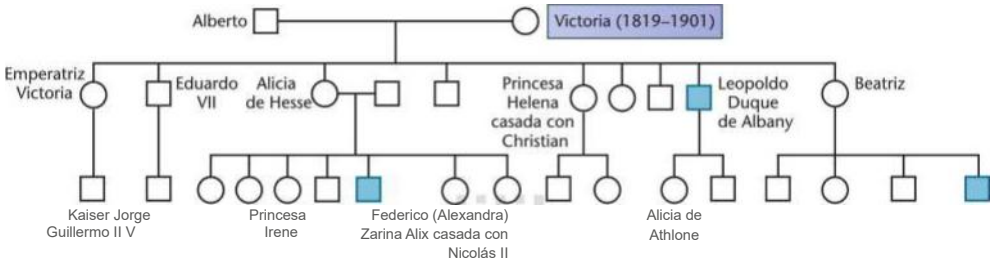
42. Florile de la patru ore au flori de multe culori. Într-o încrucișare între două tulpini pure, de culoarea cărămizii și albe, întreaga generație F1 a fost roz. În generația F2 ... Au apărut patru noi fenotipuri, împreună cu culorile parentale ale Pj și F (. Au fost obținute următoarele proporții :

1/16 purpuriu	4/16 roz
2/16 portocaliu	2/16 galben pal
1/16 galben	4/16 alb
2/16 magenta	

Propuneți o explicație pentru moștenirea culorilor acestor flori.

43. Proto-oncogenele stimulează celulele să progreseze prin ciclul celular și să înceapă mitoza. În celulele care nu se divid, transcripția proto-oncogenelor este inhibată de molecule reglatoare . Așa cum este tipic pentru toate genele, proto -oncogenele au o regiune reglatoare în ADN-ul lor , urmată de o regiune codificatoare care specifică secvența de aminoacizi a produsului genic. Luați în considerare două tipuri de mutații într-o proto-oncogenă: una în regiunea reglatoare care elimină controlul transcripțional și cealaltă în regiunea codificatoare care are ca rezultat un produs genic inactiv. Caracterizați aceste două alele mutante ca mutații cu câștig de funcție sau cu pierdere de funcție și indicați dacă acestea ar fi dominante sau recesive.

44. Mai jos este o genealogie parțială a hemofiliei în familia regală britanică descendentă a reginei Victoria, despre care se crede că a fost „purtătoarea" originală din această genealogie. Analizați genealogia și indicați care femei sunt, de asemenea, cu siguranță purtătoare . Care este probabilitatea ca prințesa Irene să fie purtătoare?



Quiasmas entre homólogos en sinapsis durante la primera profase meiótica.

5

Cartografierea cromozomială la eucariote

CONCEPTE CAPITOL

►> Cromozomii eucarioți au multe gene, situate în poziții fixe de-a lungul cromozomilor .

►► Dacă nu se separă prin încrucișare, alelele prezente într-un omolog se segregă ca o unitate în formarea gameților.

►► Încrucișarea în meioză între cromozomi omologi are ca rezultat gameți recombinanți care sporesc variația genetică.

►► Încrucișarea între gene omoloage este baza construirii hărților cromozomiale. Cu cât distanța dintre două gene de pe un cromozom este mai mare, cu atât frecvența încrucișărilor dintre ele este mai mare.

►► Recombinarea are loc și între cromozomii mitotici și între cromatidele surori.

►► Analiza linkage-ului și cartografierea cromozomilor pot fi efectuate și pentru organismele haploide, nu doar pentru cele diploide.

/ alter Sutton, împreună cu Theodor Boveri, /\ ! a fost responsabil pentru unirea *domeniile* citologiei și geneticii. (■ Încă din 1903, Sutton a subliniat posibilitatea

Se presupunea că majoritatea organismelor aveau mult mai mulți „factori" decât cromozomi. Foarte curând după aceea, investigațiile genetice efectuate pe diverse organisme au relevat faptul că anumite gene se segregau, ca și cum ar fi fost cumva legate sau unite. Investigațiile ulterioare au demonstrat că astfel de gene făceau parte din același cromozom și erau într-adevăr transmise ca o singură unitate. Acum știm că majoritatea cromozomilor poartă un număr foarte mare de gene. Genele care fac parte din același cromozom se spune că sunt *legate și* prezintă linkage în încrucișările genetice.

Deoarece cromozomul, nu gena, este unitatea de transmitere în meioză, genele legate nu sunt libere să fie transmise independent. În schimb, alelele tuturor loci-urilor de pe un cromozom ar fi, în teorie, transmise ca o unitate în formarea gameților. Cu toate acestea, în multe cazuri, acest lucru nu se întâmplă. După cum am văzut în prima profază meiotică, atunci când cromozomii omologi se împerechează (sau fac sinapse), poate avea loc un schimb reciproc de segmente cromozomiale (Capitolul 2). Această încrucișare are ca rezultat o amestecare sau recombinare a alelelor între cromozomii omologi și are loc întotdeauna în timpul etapei de tetradă.

Încrucișarea este considerată acum un proces real de rupere fizică și reunificare care are loc în timpul meiozei . Un exemplu poate fi observat în micrografia de la începutul acestui capitol. Schimbul de segmente cromozomiale oferă un potențial enorm de variație genetică în gameții produși de orice individ. Acest tip de variație, în combinație cu cea rezultată din segregarea independentă, asigură că toți urmașii vor conține un amestec divers de alele materne și paterne.

Frecvența de încrucișare între oricare două loci de pe un cromozom este proporțională cu distanța dintre ele, numită distanță interlocus. Astfel, procentul de gameți recombinanți variază în funcție de locii luați în considerare. Această corelație servește drept bază pentru construirea hărților cromozomiale, care indică pozițiile relative ale genelor pe cromozomi .

În acest capitol, vom trata în detaliu linkage -ul , crossing-ul și construirea hărților cromozomiale . Vom analiza, de asemenea, o serie de subiecte legate de schimbul de informații genetice , încheind capitolul cu întrebarea destul de intrigantă de ce Mendel, care a studiat șapte gene dintr-un organism cu șapte cromozomi, nu a găsit linkage . Sau a găsit-o?

5.1

Genele legate de pe același cromozom se separă împreună

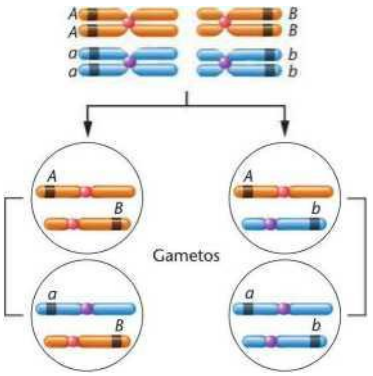
O imagine simplificată a subiectului principal al acestui *capitol* este prezentată în Figura 5.1, care contrastează consecințele meiozei în (a) segregarea independentă, (b) legătura sinaptică încrucișare și (c) în linkage *cu* încrucișare . Figura 5.1(a) ilustrează rezultatele asortării independente a două perechi de cromozomi, fiecare având o pereche de gene în heterozigoție. Nu se observă nicio linkage. Când aceiași doi cromozomi sunt observați într- un număr mare de evenimente meiotice, se constată că se formează patru gameți genetic diferiți în proporții egale, fiecare compus dintr-o combinație diferită de alele ale celor două gene.

Acum putem compara aceste rezultate cu cele produse dacă aceleași gene sunt legate pe același cromozom. Dacă nu există nicio încrucișare între cele două gene [Figura 5.1(b)], se vor forma doar două clase distincte genetic de gameți. Fiecare gamet primește alelele prezente pe unul sau celălalt omolog, care au fost transmise intacte ca urmare a segregării. Acest caz ilustrează *linkage-ul complet ,* care are ca rezultat producerea doar de gameți paterni sau nerecombinanți . Cei doi gameți paterni se formează în proporții egale. Deși linkage-ul complet între două gene apare rar, este util să se ia în considerare consecințele teoretice ale acestui concept.

Figura 5.1(c) ilustrează rezultatul atunci când are loc încrucișarea între cele două gene legate . După cum se poate observa, această încrucișare implică doar două cromatide non-surori din cele patru cromatide prezente în tetradă . Acest schimb dă naștere la două noi combinații alelice, numite *gameți* recombinante sau încrucișate. Cele două cromatide care nu sunt implicate în schimb dau naștere la gameți nerecombinanți , așa cum se arată în Figura 5.1(b). În general, frecvența de încrucișare între oricare două gene legate este proporțională cu distanța dintre locusurile lor respective de pe cromozom. Pe măsură ce distanța dintre două gene crește , proporția de gameți recombinanți crește, iar proporția de gameți paterni scade . În teorie, două gene selectate aleatoriu pot fi atât de apropiate una de cealaltă încât evenimentele de încrucișare dintre ele sunt prea rare pentru a fi detectate . Așa cum se arată în Figura 5.1(b), această legătură completă produce doar gameți paterni. Pe de altă parte, dacă cele două gene sunt separate de o distanță scurtă, se vor forma puțini gameți recombinanți și mulți gameți paterni .

După cum vom discuta din nou mai târziu în acest capitol, atunci când loci -urile a două gene legate sunt foarte depărtate , numărul de gameți recombinanți se aproximează, dar

(a) Transmisión independiente: dos genes en dos parejas diferentes de cromosomas homólogos

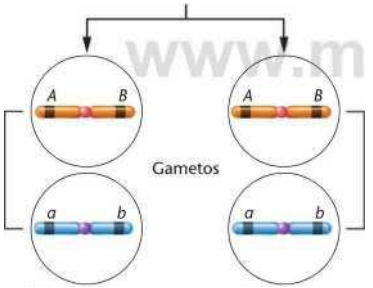


(b) Ligamiento: dos genes en una sola pareja de homólogos; no hay intercambio

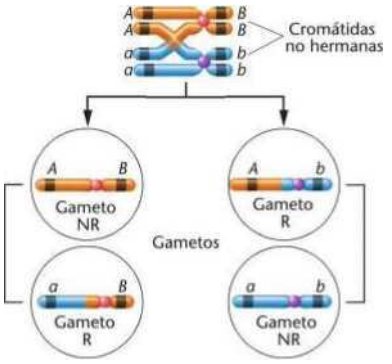
4,-» - —. B

=■- B

ori> a W *b*



(c) Ligamiento: dos genes en una sola pareja de homólogos; hay intercambio entre dos cromátidas no hermanas. Gameto R = Gameto recombinante; Gameto NR = Gameto no recombinante



Nu depășește niciodată 50%. Dacă există o recombinare de 50 % , vor fi produse patru tipuri într -un raport de 1: 1 :1 : 1 (doi gameți parentali și doi gameți recombinanți). În acest caz, transmiterea a două gene legate ar fi imposibil de distins de cea a două gene nelegate, care sunt transmise independent . Adică, proporția celor patru genotipuri posibile va fi identică, așa cum se arată în Figurile 5.1(a) și (c).

Raportul de legătură

Dacă există o legătură completă între două gene, datorită proximității lor, și se încrucișează organismele heterozigote pentru ambele loci, în generația F2 apare un raport fenotipic unic , pe care îl vom denumi raport de legătură. Pentru a ilustra acest raport, să luăm în considerare o încrucișare între două gene mutante recesive strâns legate, ochii *căprui (bw).* (maronii) și vene aripale *groase (hv)* (gros) la *Dro sophila melanogaster* (Figura 5.2). Alelele normale de tip sălbatic, *bw* și *hv'* Ambele sunt dominante și dau naștere la ochi roșii , respectiv vene fine pe aripi .

ochi căprui mutanți și vene subțiri pe aripi au fost împerecheate cu muște normale cu ochi roșii și vene groase pe aripi. Pentru a fi mai concișI, putem denumi aceste muște pur și simplu referindu-ne la fenotipurile lor mutante și putem spune că muștele cu ochi căprui au fost încrucișate cu muște cu vene groase pe aripi. Folosind - simbolurile genetice stabilite în Capitolul 4 , genele legate pot fi reprezentate prin plasarea notației alelelor lor deasupra și dedesubtul unei linii orizontale simple sau duble . Cele de deasupra liniei sunt loci situate pe un omolog, iar cele de sub linie sunt loci situate pe celălalt omolog. Astfel, putem reprezenta generația P după cum urmează :

$$\begin{matrix} hv^{+}\ bw\ hv\ bw^{+} \\ \text{Pp X - } hv^{*}\ bw\ hvbw^{*} \end{matrix}$$

subțire, maro; gros, roșu

Deoarece genele sunt situate pe un autosom, nu este necesar să se facă distincția între bărbați și femei.

În generația F1, fiecare muscă primește câte un cromozom din fiecare pereche de la fiecare părinte. Toate muscile sunt

FIGURA 5.1 Rezultatele formării gameților atunci când două gene heterozigote sunt situate (a) pe două perechi diferite de cromozomi; (b) pe aceeași pereche de omologi, dar fără schimb între ei; și (c) pe aceeași pereche de omologi, dar cu un schimb care are loc între două cromatide non-surori. Rețineți în această figură și în următoarele că membrii perechilor de cromozomi omologi sunt arătați în două culori distincte. Această convenție a fost stabilită în Capitolul 2 *(vezi,* de exemplu, Figura 2.7 și Figura 2.11).

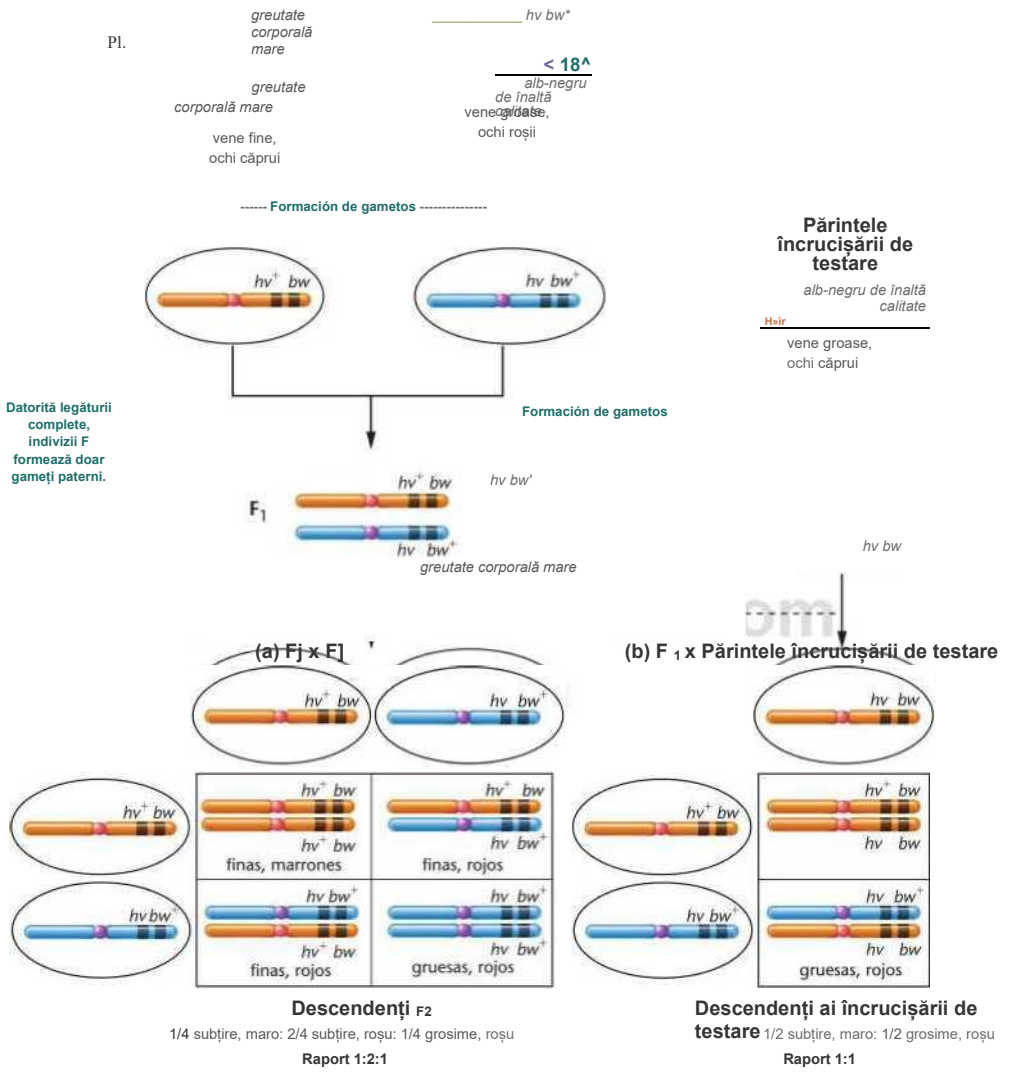


FIGURA 5.2 Rezultatele unei încrucișări între două gene situate pe același cromozom, demonstrând linkage complet, (a) Rezultatele încrucișării în generația F2 . (b) Rezultatele unei încrucișări de testare cu urmașii Fv

heterozigoți pentru ambele perechi de gene și prezintă trăsăturile dominante de vene fine și ochi roșii:

_ hv + *bw*
*' hv bw**
fini, roșii

După cum se arată în Figura 5.2(a), datorită încrucișării complete, atunci când generația F1 se încrucișează , fiecare individ F1 formează doar gameți paterni. După fertilizare, generația F2 Acest lucru va duce la un raport genotipic-fenotipic de 1:2:1. Un sfert dintre mușteleDin această generație vor avea ochi căprui și vene fine ; jumătate vor avea ambele trăsături normale, adică ochi roșii și vene fine; iar un sfert vor avea ochi roșii și vene groase. Prin urmare, raportul este 1 căprui : 2 tip sălbatic: 1 gros. Un astfel de raport de 1:2:1 este caracteristic linkage-ului complet, care se observă de obicei numai atunci când cele două gene sunt foarte strâns legate, iar numărul de urmași este relativ mic.

Figura 5.2(b) prezintă rezultatele unei încrucișări de testare cu musculițe F1. Această încrucișare are ca rezultat un raport de 1:1 de musculițe maro, subțiri și roșii, groase. Dacă genele care controlează aceste trăsături ar fi incomplet legate sau localizate pe autozomi diferiți, încrucișarea de testare ar avea ca rezultat patru fenotipuri în loc de două.

Atunci când se investighează un număr mare de gene mutante prezente la orice specie, genele situate pe același cromozom vor prezenta dovezi de linkage. Drept urmare, se pot identifica grupuri de linkage , câte unul pentru fiecare cromozom. În teorie, numărul de grupuri de linkage ar trebui să corespundă numărului haploid de cromozomi. La organismele diploide, unde un număr mare de gene mutante sunt disponibile pentru studiu genetic, această corelație este întotdeauna valabilă .

ACUM REZOLVĂ ASTA

5.1 Luați în considerare două gene ipotetice autozomal recesive *a* și *b* și, atunci când se efectuează o încrucișare de testare între un individ heterozigot și un mutant dublu homozigot, preziceți raporturile fenotipice în următoarele condiții:

(a) *a* și *b* sunt localizate pe autozomi diferiți.
(b) *a și b* sunt legate pe același autosom, dar sunt atât de departe unul de celălalt încât între ele are loc întotdeauna încrucișare .
(c) *a și b* sunt legate pe același autosom, dar sunt atât de aproape unul de celălalt încât încrucișarea între ele aproape niciodată nu are loc.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea linkage-ului, crossing-over-ului și asortării independente. Cheia soluției sale constă în conștientizarea faptului că rezultatele sunt indistinguizabile atunci când două gene nu sunt legate, comparativ cu cazul în care sunt legate, dar atât de departe una de cealaltă încât crossing-over-ul are loc întotdeauna între ele în timpul meiozei.*

5.2

Încrucișarea ca bază pentru determinarea distanței dintre gene în construcția hărților cromozomiale

■

două gene legate de același cromozom sunt selectate aleatoriu , este foarte puțin probabil ca acestea să fie atât de strâns legate încât să prezinte o legătură completă. În schimb , în încrucișările dintre două astfel de gene, un procent de urmași va fi aproape întotdeauna produs din gameți recombinanți. Acest procent va varia în funcție de distanța dintre cele două gene de-a lungul cromozomului . Acest fenomen a fost explicat pentru prima dată în 1911 de doi geneticieni specializați în Drosophila : *Thomas* H. Morgan și elevul său Alfred H. Sturtevant.

Morgan și amestecul

După cum vă veți aminti din explicațiile oferite în Capitolul 4, Morgan a fost primul care a descoperit fenomenul legăturii X. În studiile sale, el a investigat numeroase mutații ale *genei Drosophila.* situat pe cromozomul X. Analiza sa inițială, bazată pe încrucișări care implică o singură genă de pe cromozomul X, a condus la descoperirea moștenirii legate de cromozomul X. Cu toate acestea, când a analizat încrucișările care implică două gene legate de cromozomul X, rezultatele sale au fost inițial derutante. De exemplu , a încrucișat musculițe femele care exprimă mutantul corp galben (y) *și* mutantul ochi alb (w) . albe, cu masculi de tip sălbatic (corp gri și ochi roșii). Femelele F1 au fost de tip sălbatic, dar masculii F2 au exprimat ambele trăsături mutante. În generația F2 , marea majoritate a urmașilor a prezentat fenotipurile parentale așteptate - musculițe cu corp galben și ochi albi și musculițe de tip sălbatic (corp gri și ochi roșii). Musculițele rămase, mai puțin de 1,0%, aveau fie corp galben și ochi roșii, fie corp gri și ochi albi . Era ca și cum cele două alele mutante s-ar fi separat cumva una de cealaltă pe omolog în timpul formării gameților la musculițele femele F1 . Acest rezultat este ilustrat în încrucișata A din Figura 5.3, folosind date colectate ulterior de Sturtevant.

Când Morgan a studiat alte gene legate de cromozomul X, *el* a observat același model de bază , dar proporția fenotipurilor în F2 a diferit. De exemplu, când a încrucișat mutanți cu ochi *albi* și aripi *în miniatură* (miniatură) cu mușteTip sălbatic , doar 65,5 % din totalul mușteloF2 A prezentat fenotipuri paterne, în timp ce 34,5 % dintre urmași păreau ca și cum genele mutante s - ar fi separat în timpul formării gameților .

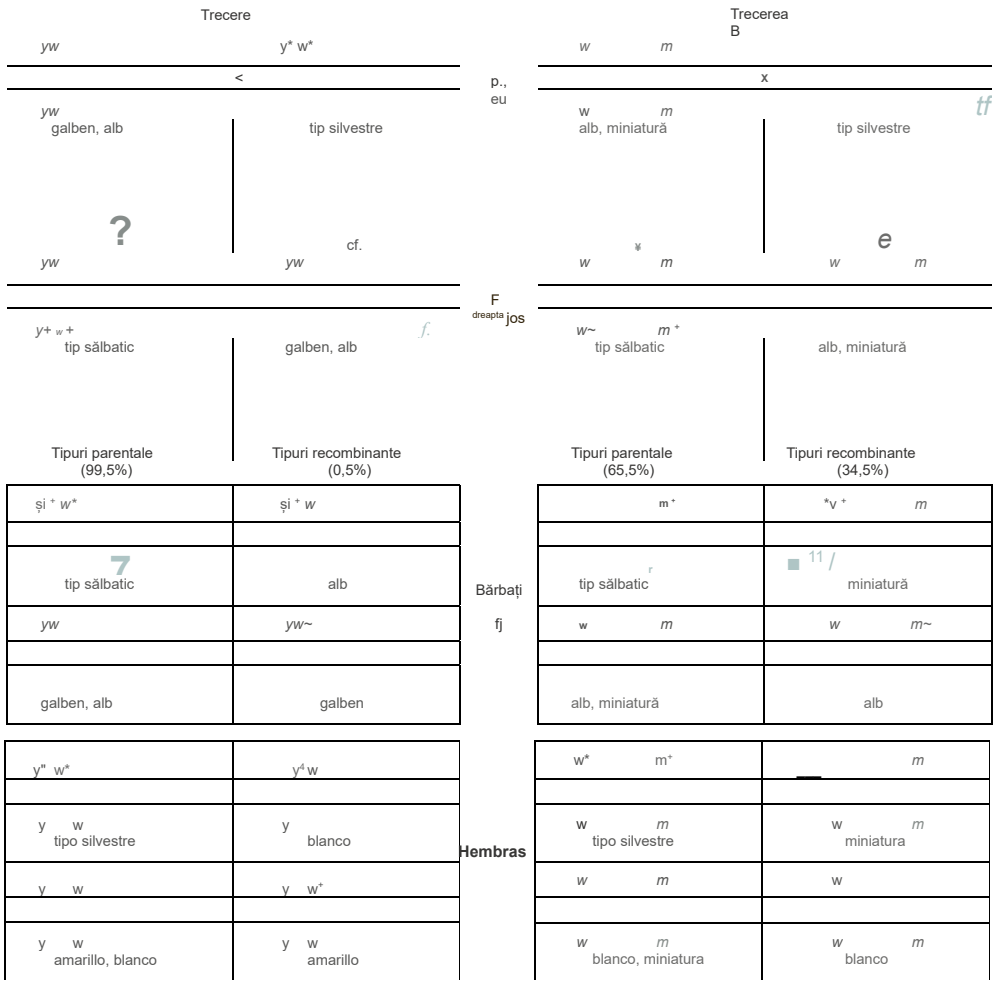


FIGURA S.3 Rezultatele pentru F1 și F2 din încrucișările care implică mutațiile galben (y) și *alb (w) (* încrucișarea A) și mutațiile *albe, miniaturale* (încrucișarea B), așa cum au fost colectate de Sturtevant . În încrucișarea A, 0,5 % dintre muștele F2 (Masculii și femelele) prezintă fenotipuri recombinante, exprimând *alb sau galben*. În încrucișarea B , 34,5 % dintre muștele F2 (masculi și femele) prezintă fenotipuri recombinante, care sunt mutanți *miniaturali* sau *mutanți albi.*

Acest lucru este ilustrat la intersecția B din Figura 5.3, folosind din nou date colectate ulterior de Sturtevant.

Morgan s-a confruntat cu două întrebări: (1) Care a fost cauza separării genelor? și (2) De ce a variat frecvența separării aparente în funcție de genele studiate? Răspunsul lui Morgan la prima întrebare s-a bazat pe cunoștințele sale despre observațiile citologice anterioare făcute de F.A. Janssens și alții. Janssens observase că cromozomii omologi din sinapsis în timpul meiozei se împleteau între ei, producând chiasme, intersecții în formă de X unde punctele de suprapunere erau evidente (vezi fotografia cu

(începutul capitolului). Morgan a propus că aceste chiasmate ar putea reprezenta puncte de schimb genetic.

Observând încrucișările prezentate în Figura 5.3, Morgan a postulat că, dacă ar avea loc un schimb de material cromozomial în timpul formării gameților, la o chiasmă între genele mutante situate pe cei doi cromozomi X ai femelelor F1, ar rezulta aceste fenotipuri caracteristice. El a sugerat că astfel de schimburi ar da naștere la gameți recombinanți atât în *încrucișările miniaturale galben-albe* , cât și în cele albe, comparativ cu gameții parentali care nu au suferit niciun schimb. Pe baza acestui experiment și a altora, Morgan a concluzionat că genele legate sunt aranjate într-o secvență liniară de-a lungul cromozomului și că există o frecvență variabilă de schimb între oricare două gene în timpul formării gameților.

Ca răspuns la a doua întrebare, Morgan a propus că este mai puțin probabil să se formeze o chiasmă între două gene situate relativ aproape una de cealaltă decât dacă cele două gene sunt departe una de cealaltă pe cromozom. Prin urmare, cu cât două gene sunt mai apropiate, cu atât este mai puțin probabil să se producă schimburi genetice între ele. Morgan a fost primul care a propus termenul de *crossing over pentru* a descrie schimbul fizic care duce la recombinare.

Sturtevant și cartografierea genetică

Alfred H. Sturtevant, un elev al lui Morgan, a fost primul care și-a dat seama că propunerea profesorului său putea fi folosită pentru a cartografia secvența genelor legate. Potrivit lui Sturtevant,

> „Într-o conversație cu Morgan... mi-am dat seama brusc că variațiile în puterea legăturilor, deja atribuite de Morgan diferențelor în separarea spațială a genelor, ofereau posibilitatea determinării secvențelor în dimensiunea liniară a unui cromozom. M-am dus acasă și am petrecut o mare parte a nopții (neglijând temele mele de student) obținând prima hartă cromozomilor."

Într-un articol publicat în 1913, Sturtevant a compilat date despre numeroase încrucișări efectuate de Morgan și alți geneticieni care implică recombinarea între genele reprezentate de mutanții *galben, alb* și *miniatural* . Un subset al acestor date este prezentat în Figura 5.3 . Frecvențele de recombinare între fiecare pereche a acestor trei gene sunt următoarele:

(1)	*galben, alb*	0,5 %
(2)	*alb, miniatural*	34,5 %
(3)	*galben, miniatură*	35,4%

Întrucât suma dintre (1) și (2) este aproximativ egală cu (3), Sturtevant a susținut că frecvențele de recombinare dintre genele legate sunt aditive. Pe baza acestui fapt, el a prezis că ordinea genelor de pe cromozomul X era *galben -alb-miniatură.* Pentru a ajunge la această concluzie, el a raționat după cum urmează: genele *galbene* și *alb* Se pare că sunt apropiate una de cealaltă deoarece frecvența lor de recombinare este scăzută. Cu toate acestea, aceste două gene sunt situate departe de gena *miniaturală* . din cauza combinațiilor *alb-miniatură* și *miniatură galbenă Acestea* prezintă frecvențe de recombinare ridicate. Deoarece miniaturale Prezintă o frecvență de recombinare mai mare cu *galben* decât cu *alb* (35,4% și 34,5%), rezultă că *albul* Se află între celelalte două gene , nu în afara lor.

Sturtevant știa din munca lui Morgan că frecvența de interschimbare putea fi considerată o estimare a distanței dintre două gene sau loci de - a lungul cromozomului . El a construit o hartă pentru cele trei gene de pe cromozomul X, cu unitatea de hartă (m) egală cu 1% recombinare între oricare două gene *. În exemplul de mai sus, distanța dintre *galben* și *alb* Ar fi 0,5 unități de hartă (m) și între *galben* și *miniatură* de 35,4 µm. Rezultă că distanța dintre *galben* și *miniatură* Ar trebui să fie (35,4 - 0,5) sau 34,9 µm. Această estimare este foarte apropiată de frecvența reală de recombinare dintre *leucocitele din sânge.* și *miniaturală* (34,5 µm). Harta pentru aceste trei gene este prezentată în Figura 5.4. Faptul că aceste numere nu sunt perfect aditive se datorează variațiilor normale care pot fi așteptate între încrucișări, ceea ce duce la apariția micilor inexactități pe care le constatăm atunci când efectuăm independent experimente de cartografiere genetică .

Pe lângă aceste trei gene, Sturtevant a luat în considerare încrucișările care implică alte două gene de pe cromozomul X și a obținut o hartă mai largă care includea toate cele cinci gene. Foarte curând după aceea, el și colegul său, Calvin Bridges, au început să investigheze linkage-ul autozomal la *Drosophila.* Până în 1923, ei demonstraseră clar că linkage-ul și crossing -ul nu se limitau la

---

* În onoarea lucrării lui Morgan, o unitate de hartă (m) este adesea numită centiMorgan (cM). Chiar dacă crossing-ul are loc în 100 % din cazuri între două gene legate, recombinarea va fi observată ulterior doar la 50 % din gameții potențiali formați . Acest concept este ilustrat în Figura 5.6. Teoretic, dacă luăm în considerare doar schimburi individuale între o anumită pereche de loci și observăm 20 % gameți recombinanți , crossing-ul are loc de fapt între acești doi loci în 40 % din tetrade. Regula generală este că, în aceste condiții, procentul de tetrade implicate într- un schimb între două gene este de două ori mai mare decât cel al gameților recombinanți produși . Prin urmare , limita teoretică a recombinării observate datorată crossing-ului este de 50 % .

Când două gene legate sunt separate prin mai mult de 50 de unități de hartă , încrucișarea dintre ele poate fi teoretic așteptată în 100 % din tetrade. Dacă această predicție s-ar îndeplini, fiecare tetradă ar produce cei patru gameți din Figura 5.6 în proporții egale , ca și cum genele ar fi pe cromozomi diferiți și ar fi moștenite independent. Din diverse motive, această limită teoretică este rareori atinsă.

genele legate .

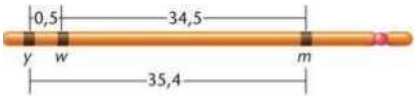


FIGURA 5.4 Harta genelor de pe cromozomul X al genei *Drosophila melanogaster galben* (y), *alb* (w) și *miniatural* (m). Fiecare număr reprezintă procentul de urmași recombinanți produși în fiecare dintre cele trei încrucișări, fiecare implicând două gene diferite.

la cromozomul X și au reușit să demonstreze acest lucru și în autozomi. În timpul acestei lucrări, au făcut o altă observație interesantă. Au demonstrat că crossing-ul la *Drosophila* a avut loc doar la femele. Faptul că crossing -ul nu a avut loc la masculi a făcut analiza hărților mult mai puțin complexă la *Drosophila.* Deși - crossing-ul are loc la ambele sexe în majoritatea celorlalte organisme, se observă în general că crossing-ul la masculi apare mai rar decât la femele. De exemplu, la oameni, o astfel de recombinare are loc la masculi la o frecvență egală cu 60% din frecvența observată la femele.

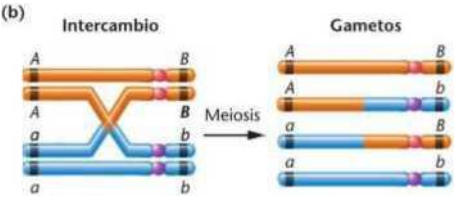
Deși s-au adus multe îmbunătățiri cartografierii cromozomiale de la lucrările inițiale ale lui Sturtevant, principiile sale de bază sunt acceptate ca fiind corecte și au fost utilizate pentru a obține hărți cromozomiale detaliate ale organismelor în care se cunosc un număr mare de gene mutante legate. Pe lângă faptul că au oferit fundamentul pentru cartografierea cromozomială, descoperirile lui Sturtevant au fost semnificative din punct de vedere istoric pentru domeniul geneticii. În 1910, teoria cromozomială a moștenirii era încă subiectul unor dezbateri intense. Chiar și Morgan era sceptic față de teoria sa înainte de a efectua cea mai mare parte a experimentelor sale . Acum, cercetările au stabilit ferm că cromozomii poartă gene într-o ordine liniară și că aceste gene sunt echivalentele factorilor lui Mendel.

Împletituri simple

De ce ar influența distanța relativă dintre doi loci cantitatea de recombinări și încrucișări observate între ele? În meioză , un număr limitat de evenimente de încrucișare au loc în cadrul fiecărei tetrade . Aceste evenimente recombinante se întâmplă aleatoriu de-a lungul tetradei . Prin urmare, cu cât doi loci sunt mai apropiați de-a lungul axei cromozomilor, cu atât este mai puțin probabil să aibă loc o singură încrucișare între ele. Același raționament sugerează că, cu cât doi loci sunt mai îndepărtați , cu atât este mai probabil să aibă loc o încrucișare aleatorie între ele.

În Figura 5.5(a), crossing-ul are loc între două cromatide nesurori, dar nu între cele două loci studiate ; prin urmare, crossing-ul trece nedetectat deoarece nu se produc gameți recombinanți pentru cele două trăsături de interes. În Figura 5.5(b), unde cele două loci sunt destul de depărtate, crossing-ul are loc între ele, rezultând gameți în care trăsăturile de interes sunt recombinate.

Când are loc încrucișarea între două cromatide nesurori , celelalte două cromatide ale tetradei nu sunt implicate în acest schimb și pot trece intacte la



schimbul trece nedetectat . În (b) schimbul separă cele două alele, dând naștere la gameți recombinanți, care sunt detectabili.

FIGURA SS Două exemple de recombinare simplă între două cromatide nesurori și gameții produși ulterior. În (a) schimbul nu modifică relațiile de linkage dintre alelele celor două gene, formând doar gameți parentali, iar

Hay Intercambio de segmentos entre dos cromátidas hermanas...

Hay intercambio de segmentos entre dos cromátidas no hermanas...

...pero el ligamiento entre los alelos A y a, y entre los alelos B y b, no cambia.

...y los alelos se han recombinado en dos de los cuatro gametos.

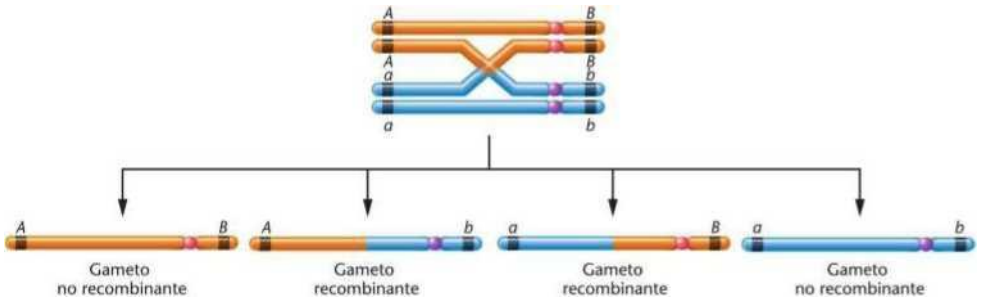


FIGURA 5.6 Consecuencias de un entrecruzamiento sencillo entre dos cromátidas no hermanas durante el estadio de tétrada. Se producen dos gametos no recombinantes (paternos) y dos recombinantes.

Determinarea secvenței genetice în crearea unei hărți se bazează pe analiza încrucișărilor multiple

Studierea încrucișărilor simple între două gene legate oferă baza pentru determinarea *distanței* dintre ele. Cu toate acestea, atunci când se studiază mai multe gene legate, determinarea *secvenței lor* de-a lungul cromozomului devine mai dificilă. Din fericire, descoperirea faptului că au loc schimburi multiple între cromatidele unei tetrade a facilitat procesul de construire a hărților cromozomiale mai mari. După cum vom vedea mai jos, atunci când se investighează simultan trei sau mai multe gene legate, este posibil să se determine mai întâi secvența genei și apoi distanța dintre ele.

ACUM REZOLVĂ ASTA

5.2 Cu două perechi de gene implicate *(P/p* și *Z/z),* o încrucișare de testare *(ppzz)* cu un organism cu genotip necunoscut a dus la următoarele raporturi de gameți:

PZ, 42,4%; *Pz,* 6,9%; *pZ,* 7,1%; *pz,* 43,6%

Trageți toate concluziile posibile din aceste date .

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea relației dintre frecvența de crossing-over și distanța genică. Cheia soluției sale constă în recunoașterea faptului că gameții nerecombinanți și recombinanți sunt produși în perechi reciproce în proporții aproximativ egale.*

Treceri multiple

Este posibil ca în cadrul unei singure tetrade să aibă loc două, trei sau mai multe schimburi între cromatide non-surori, ca urmare a unor evenimente multiple de crossing-over. Schimburile duble de material genetic duc la dublă recombinare (DR), așa cum se arată în Figura 5.7. Pentru a studia un schimb dublu, trebuie investigate trei perechi de gene, fiecare heterozigotă pentru două alele. Înainte de a putea determina frecvența de recombinare între cele trei loci, trebuie să trecem în revistă câteva calcule simple de probabilitate.

După cum am văzut deja, probabilitatea unui schimb simplu între genele *A* și *B* sau între genele B și C este direct proporțională cu distanța dintre loci-urile respective. Cu cât A este mai aproape de *B , cu atât este mai mare probabilitatea unui schimb simplu.* și *B.* În C, un schimb simplu între oricare dintre cele două grupuri de loci este mai puțin probabil . În cazul unei încrucișări duble, trebuie să aibă loc simultan două evenimente sau schimburi distincte și independente. Probabilitatea matematică ca două evenimente independente să aibă loc simultan este egală cu produsul probabilităților individuale . Aceasta este *regula produsului pe* care am văzut-o anterior în Capitolul 3.

schimburi individuale între *A* și *B* sunt recuperați în proporție de 20% (p = 0,20) și că gameții recombinanți rezultați din schimburi individuale între *B* și *C sunt recuperați* în proporție de 30 % (p = 0,30). Probabilitatea de a recupera un gamet dublu recombinant produs ca urmare a două schimburi (între *A* și B și între B și C) poate fi prezisă a fi egală cu (0,20)(0,30) = 0,06, sau 6 %. Acest calcul arată că frecvența așteptată a gameților dublu recombinanți va fi întotdeauna mult mai mică decât cea a oricărui gamet recombinant individual.

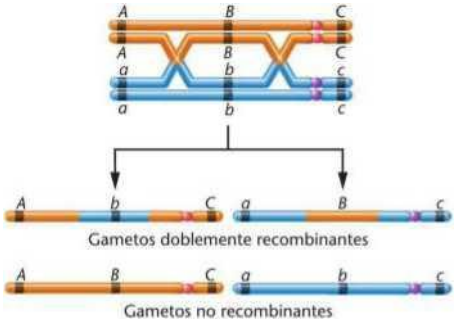


FIGURA S.7 Consecințele unui schimb dublu între două cromatide nesurori. Deoarece schimbul implică doar două cromatide, se produc doi gameți nerecombinați și doi gameți dublu recombinați. Fotografia de deschidere a capitolului ilustrează mai multe chiasmate prezente într-o tetradă izolată în timpul primei profaze meiotice.

Dacă trei gene sunt relativ apropiate una de cealaltă pe un cromozom , frecvența așteptată a gameților dublu recombinanți va fi extrem de mică. De exemplu, să presupunem că distanța *AB* În Figura 5.7, fie distanța BC de 3 µm, iar distanța BC de 2 µm. Frecvența așteptată a încrucișărilor duble va fi (*0,03*)(0,02) = 0,0006, sau 0,06%. Aceasta reprezintă doar 6 apariții din 10.000. Prin urmare , într-un experiment de mapare care implică două gene strâns legate, va fi necesar un număr mare de urmași pentru a detecta evenimente de recombinare dublă . În acest exemplu, ar fi puțin probabil să detectăm o încrucișare dublă chiar dacă am examina 1.000 de urmași. Astfel, este clar că, dacă sunt mapate patru sau cinci gene, frecvența așteptată pentru încrucișările triple sau cvadruple va fi și mai mică.

Hartă în trei puncte în *Drosophila*

Informațiile prezentate în secțiunile anterioare oferă o bază pentru cartografierea a trei sau mai multe gene legate într-o singură încrucișare. Pentru a ilustra în detaliu procesul de cartografiere, vom examina două situații care implică trei gene legate în două organisme destul de diferite.

Pentru a efectua cu succes o operațiune de referință încrucișată a hărții, trebuie îndeplinite trei criterii:

I. Genotipul organismului care produce gameții recombinanți trebuie să fie heterozigot în toate locusurile luate în considerare. Dacă homozigoția este prezentă în orice locus, toți gameții produși vor avea aceeași alelă, ceea ce face imposibilă analiza cartografierii .

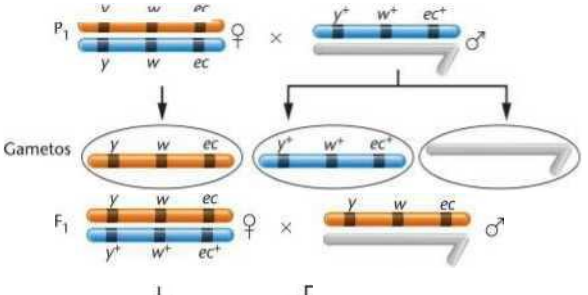
2. Încrucișarea trebuie concepută astfel încât genotipurile tuturor gameților să poată fi determinate cu precizie prin observarea fenotipurilor urmașilor rezultați . Acest lucru este necesar deoarece gameții și genotipurile lor nu pot fi niciodată observate direct. Pentru a depăși această problemă, fiecare clasă fenotipică trebuie să reflecte genotipul gameților de la părinții care îi produc.
3. În experimentul de cartografiere, trebuie obținut un număr suficient de urmași pentru a recupera un eșantion reprezentativ din toate clasele recombinante .

Aceste criterii sunt îndeplinite în încrucișarea pentru o hartă în trei puncte a *Drosophila melanogaster* prezentată în Figura 5.8. În această încrucișare, sunt luate în considerare trei gene mutante recesive legate de X - culoarea *galbenă a corpului.* (galbeni), ochi albi *și* formă de ochi *de echinus* (mari și ridați) . Pentru a crea o diagramă a încrucișării, *trebuie să presupunem o anumită ordine teoretică, chiar dacă nu știm încă dacă este corectă.* În Figura 5.8, vom presupune inițial că ordinea celor trei gene este *yw-ec.* Dacă acest lucru nu este corect, analiza noastră o va dovedi și va dezvălui ordinea corectă .

În generația ?! , masculii hemizigoți pentru cele trei alele de tip sălbatic sunt încrucișați cu femele homozigote pentru cele trei alele mutante recesive. Prin urmare, masculii P vor fi de tip sălbatic în ceea ce privește culoarea corpului , culoarea ochilor și forma ochilor și se spune că au un fenotip de *tip sălbatic.* Pe de altă parte, femelele vor prezenta cele trei trăsături mutante: culoarea galbenă a corpului , ochi albi și forma ochilor de echinus .

Această încrucișare are ca rezultat o generație F _t cu femele heterozigote pentru toate cele trei loci și masculi care, datorită cromozomului Y, sunt hemizigoți pentru toate cele trei alele mutante . Fenotipic, toate femelele p_t au un fenotip de tip sălbatic , în timp ce masculii F_t sunt galbeni, albi și echinus . Genotipul femelelor F _t îndeplinește primul criteriu pentru construirea unei hărți genetice cu trei legături ; adică , sunt heterozigote la toate cele trei loci și pot servi drept origine a gameților recombinanți generați prin încrucișare . Rețineți că, datorită genotipurilor părinților p_t, cele trei alele mutante sunt situate pe un omolog, iar cele trei alele de tip sălbatic pe celălalt. Cu alți părinți , ar fi posibile *alte aranjamente care ar putea produce un genotip heterozigot.* De exemplu, o femelă heterozigotă ar putea avea alelele mutante *y* și *ec* într-un omolog și alela *w* în celălalt . Acest lucru s-ar întâmpla dacă unul dintre părinții săi ar fi galben și echinus , iar celălalt alb.

În încrucișarea noastră, al doilea criteriu este îndeplinit datorită gameților formați de masculii F1 . Fiecare gamet va avea fie un cromozom X cu cele trei alele mutante, fie un cromozom Y , care nu conține niciunul dintre cele trei loci.



Gameți

Origen de los gametos femeninos	Gametos	y w ec		Fenotipo F_2	Número observado	Categoría, total y porcentaje
NR	①	y w ec / y w ec	y w ec	y w ec	4685	**No recombinantes**
	②	y^+ w^+ ec^+	y^+ w^+ ec^+	y^+ w^+ ec^+	4759	9.444 94,44%
RS	③	y w^+ ec^+	y w^+ ec^+	y w^+ ec^+	80	**Recombinación sencilla entre *y* y *w***
	④	y^+ w ec	y^+ w ec	y^+ w ec	70	150 1,50%
RS	⑤	y w ec^+	y w ec^+	y w ec^+	193	**Recombinación sencilla entre *w* y *ec***
	⑥	y^+ w^+ ec	y^+ w^+ ec	y^+ w^+ ec	207	400 4,00%
DR	⑦	y w^+ ec	y w^+ ec	y w^+ ec	3	**Doble recombinación entre *y* y *w* y entre *w* y *ec***
	⑧	y^+ w ec^+	y^+ w ec^+	y^+ w ec^+	3	6 0,06%

FIGURA 5.8 Cruce pentru o hartă în trei puncte a genelor *galben* (y *sau y'), alb (w* sau *w*) *și echinus (ec* **sau** *ec*)* de la *Drosophila melanogaster.* NR, RS, DR **se referă** la grupuri nerecombinante, monorecombinante și respectiv dublu recombinante. Centromerii cromozomilor nu au fost desenați și, inițial, în coloana din stânga sunt reprezentate **doar două** cromatide **nesurori** .

care sunt luate în considerare. Indiferent de care dintre cele două tipuri participă la fertilizare, genotipul gameților produși de femela F va fi exprimat fenotipic la femelele F2 și la masculii descendenți din ea. Prin urmare, toți gameții, recombinanți sau nu, produși de femelele F pot fi detectați prin observarea fenotipurilor F2 .

Odată ce aceste două criterii sunt îndeplinite, putem construi o hartă cromozomială din încrucișările prezentate în Figura 5.8. Mai întâi, trebuie să determinăm ce fenotipuri F2 corespund diferitelor - categorii recombinante și nerecombinante. Pentru a determina fenotipurile F2 nerecombinante , trebuie să identificăm indivizii derivați din gameții paterni formați de F_P feminin . Fiecare dintre acești gameți va conține un *cromozom X neafectat de încrucișare* . Ca o consecință a segregării , vor fi produse cantități aproximativ egale din cele două tipuri de gameți și, prin urmare, vom obține și proporții aproximativ egale din fenotipurile F2 corespunzătoare acestora . Deoarece derivă dintr-un individ heterozigot, genotipurile celor doi gameți paterni și fenotipurile F2 se completează reciproc (de exemplu, dacă unul este de tip sălbatic, celălalt va fi mutant pentru toate cele trei gene). Acesta este cazul în încrucișarea pe care o analizăm. În alte situații, dacă un cromozom prezintă o alelă mutantă, al doilea cromozom va prezenta celelalte două alele mutante și așa mai departe. Din acest motiv, aceste clase de gameți și fenotipuri se numesc clase reciproce.

Cele două fenotipuri nerecombinante sunt mai ușor de recunoscut deoarece se găsesc într- *o proporție mai mare de urmași.* Figura 5.8 arată că gameții (1) și (2) sunt prezenți în număr mai mare. Prin urmare, mușteleă galbene, albe și de tip echinus, precum și cele care sunt normale sau de tip sălbatic pentru toate cele trei trăsături , constituie categoria nerecombinante și reprezintă 94,44% din urmașii F2 .

A doua clasă care poate fi ușor detectată este reprezentată de fenotipuri dublu recombinante. Datorită probabilității lor scăzute de apariție, *acestea ar trebui să fie prezente în număr cât mai mic posibil.* Rețineți că acest grup reprezintă două încrucișări simple independente, dar simultane . Pot fi identificate două fenotipuri reciproce: gametul 7, care prezintă trăsăturile mutante galben și echinus, dar are culoarea normală a ochilor ; și gametul 8, care prezintă trăsătura mutantă albă, dar are culoarea corpului și forma ochilor normale . Împreună, aceste fenotipuri dublu recombinante constituie doar 0,06 % din urmașii F2 .

Cele patru clase fenotipice rămase reprezintă două categorii rezultate din încrucișări simple. Gameții 3 și 4, care sunt fenotipuri reciproce produse prin evenimente de încrucișare simple între *loci galben* și alb , *reprezintă* 1,50% din urmașii F2 . Gameții 5 și 6, care constituie 4,00 % din urmașii F2 , reprezintă fenotipurile reciproce rezultate din evenimente de încrucișare simple între loci albi și echinus .

Acum putem calcula distanța pe hartă pentru cele trei loci. Distanța dintre *y* și *w,* sau între *w* și *ec,* este egal cu procentul tuturor schimburilor detectate care au loc între ele. Pentru oricare două dintre genele luate în considerare, acestea vor include toate recombinantele simple plus toate recombinantele duble. *Acestea din urmă sunt incluse deoarece reprezintă două încrucișări simple simultane.* Pentru genele *și* Acestea includ clasele 3, 4, 7 și 8, totalizând 1,50 % + 0,06%, sau 1,56 µm. În mod similar , distanța dintre w și *ec* este egală cu procentul de urmași rezultați dintr-un schimb între aceste două loci: gameții 5 , 6, 7 și 8, totalizând 4,00 % + 0,06 %, sau 4,06 µm. Harta acestor trei loci ai cromozomului X este prezentată în partea de jos a Figurii 5.8.

Determinarea ordinii genelor

În exemplul anterior, am presupus că ordinea sau secvența celor trei gene de pe cromozom era *yw-ec. Analiza* noastră a confirmat că această secvență este în concordanță cu datele. Cu toate acestea, în multe experimente de cartografiere, ordinea genelor este necunoscută, iar aceasta constituie o altă variabilă în analiză. Dacă ordinea genelor nu ar fi fost cunoscută în acest exemplu, am fi putut folosi una dintre cele două metode (discutate mai jos) pentru a o determina. Va trebui să selectați una dintre aceste metode și să o utilizați în propria analiză.

Metoda 1. Această metodă se bazează pe faptul că există doar trei aranjamente posibile, fiecare cu una dintre gene la mijlocul celorlalte două:

(I) *wy-ec (și* (este în mijloc)

(II) *y-ec-w (ec* este la mijloc)

(III) *yw-ec (w* (este în mijloc)

Aplicați următorii pași în analiza dvs. pentru a determina ordinea genelor :

1. Presupunând oricare dintre cele trei aranjamente, - determinați mai întâi *poziția alelelor* în fiecare omolog al părintelui heterozigot care a dat naștere gameților recombinanți și nerecombinanți (femelele F, în exemplul nostru).
2. Determinați dacă în această situație a avut loc un eveniment de dublă încrucișare pentru a produce *fenotipurile dublu recombinante observate.* Rețineți că aceste fenotipuri apar mai rar și pot fi ușor de identificat.

3. Dacă această ordine nu produce fenotipurile corecte, încercați fiecare dintre celelalte două posibilități. Una dintre cele trei trebuie să funcționeze!

Acești pași sunt ilustrați în Figura 5.9 pentru încrucișarea yw - *ec* . Cele trei ordonări posibile sunt etichetate I, II și III, așa cum s-a indicat anterior.

1. Dacă presupunem că y este între *w* și *ec* (aranjament I), distribuția alelelor printre omologii indivizilor F1 heterozigoți este:

w și *ec*

w* y* ec*

Știm acest lucru datorită modului în care s-a încrucișat generația Pj . Femelele P1 au contribuit cu un cromozom X care purta alelele *w, y și ec.* în timp ce masculul P a contribuit cu un cromozom X cu alelele w , y și ec*.

2. O dublă încrucișare în situația anterioară ar produce următorii gameți:

TV y* ec yw* y ec*

După fertilizare, dacă gena se află la mijloc, fenotipurile F2 dublu recombinante vor corespunde acestor genotipuri gametice, rezultând urmași care vor exprima fenotipurile alb și echinus și urmași care vor exprima fenotipul galben. Cu toate acestea, determinarea încrucișărilor duble reale relevă faptul că acestea sunt musculițe galbene, echinus și albe. *Prin urmare, ordinea pe care am presupus-o este incorectă.*

3. Dacă luăm în considerare ordonarea II cu alelele *edec~* în mijloc, sau aranjamentul III cu alelele w/w* în mijloc:

$$\text{(II)}\ \frac{y \quad ec \quad wyw}{y^* \quad ec^* \quad w^*} \text{ - sau (III) } \frac{ec \quad y \quad w}{y^* \quad w^* \quad ec^*}$$

Vedem din nou că ordonarea II *prezice* fenotipuri dublu recombinante care nu corespund fenotipurilor dublu recombinante reale (observate) . Fenotipurile prezise sunt musculițe galbene, *musculițe albe* și musculițe echinus în generația F1. *Prin urmare , și această ordonare este incorectă.* Totuși, ordinea III va produce fenotipurile observate: muște galbene, muște echinus și muște albe. *Prin urmare, această ordine, unde eigenul* Dacă w *este la mijloc, este cel corect.*

Rezumatul metodei I. Mai întâi , determinați aranjamentul alelilor pe omologii indivizilor heterozigoți care produc gameți recombinanți prin identificarea fenotipurilor reciproce nerecombinante . Apoi, testați fiecare dintre cele trei aranjamente posibile pentru a determina care dintre ele produce fenotipurile dublu recombinante observate - *cel care produce acest lucru va reprezenta aranjamentul corect.* Această metodă este rezumată în Figura 5.9.

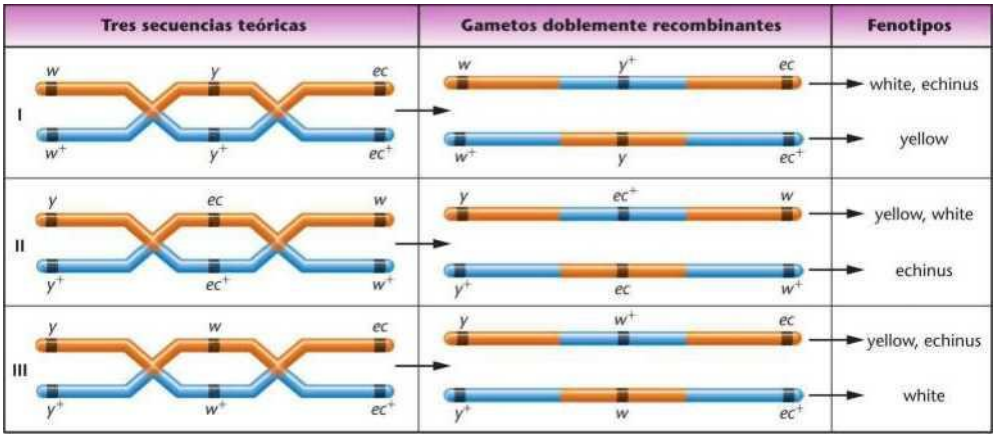


FIGURA 5.9 Las tres posibles secuencias de los genes *white,yellow y echinus,* los resultados de una recombinación doble en cada caso *y* los fenotipos resultantes que se producen en un cruce prueba. Para simplificar, se han omitido las dos cromátidas no recombinantes de cada tétrada.

Metoda II. Metoda II începe, de asemenea, prin determinarea aranjamentului alelilor pe fiecare omolog al părintelui heterozigot. În plus, este necesară o presupunere suplimentară:

După o dublă încrucișare, alela situată în poziția intermediară se va găsi între alelele externe care erau prezente anterior în omologul parental opus.

Pentru a ilustra acest lucru, să presupunem ordinul I, *wy-ec,* în următorul aranjament:

da

w $^{+}$ *y**

După o dublă încrucișare, alelele *și* Hei * Acestea vor fi găsite inversate în această situație:

w y ec*

w da**

După segregare, se formează doi gameți

w y' ec y iv* y ec**

Deoarece genotipul gametului va fi exprimat direct în fenotip după fertilizare, fenotipurile dublu recombinante vor fi:

muște albe, muște echinus și muște galbene

Rețineți că *alela galbenă,* despre care am presupus că se află în centru, este acum asociată cu cei doi markeri externi ai celuilalt omolog, w $^{+}$ și *ec**. Totuși, aceste fenotipuri așteptate nu corespund fenotipurilor dublu recombinante observate. Prin urmare, gena galbenă *nu* este centrală .

Același raționament poate fi aplicat presupunerii că gena *echinus* sau gena *albă* se află în poziția centrală. În primul caz, vom ajunge la o concluzie negativă . Dacă presupunem că gena *albă* Se află în centru; rezultatele așteptate și cele observate pentru - genotipurile dublu recombinate coincid. Prin urmare, concluzionăm că gena *albă este situată între* genele *galben* și *echinus* .

Rezumatul metodei 11. Determinați aranjamentul alelelor pe omologii indivizilor heterozigoți care produc gameți recombinanți. Apoi, examinați fenotipurile reale dublu recombinante și identificați alela singulară care a fost schimbată, astfel încât să nu mai fie asociată cu alelele sale vecine originale. Această alelă va fi cea situată între celelalte două în cadrul aranjamentului genic.

În exemplul nostru, *y, ec* și *w* se găsesc pe un omolog la individul heterozigot F1, în timp ce *y*, ec1* și *w'* se găsesc pe celălalt. În clasele dublu recombinante F2 , w și w' au fost cele care au fost schimbate. Acum , alela w este asociată cu y $^{+}$ și ec *. în timp ce alela w' este asociată cu alelele *y* și *ec.* Prin urmare, gena *albă se află în centru, iar* genele *galben* și *echinus* sunt markerii flancanți.

O problemă de cartografiere la porumb

După ce am stabilit principiile de bază ale construcției hărții cromozomiale, să luăm în considerare acum o problemă conexă la porumb. Această analiză diferă de exemplul anterior în două aspecte. În primul rând, încrucișarea anterioară utilizată pentru a construi harta a implicat gene legate de X. Aici, genele luate în considerare sunt autozomale. În al doilea rând, în discuția acestei încrucișări, vom schimba utilizarea simbolurilor așa cum s-a sugerat inițial în Capitolul 4. În loc să folosim simboluri genetice și exponenți (de exemplu, *bm* $^{+}$, v $^{+}$ și *pr*),* vom folosi pur și simplu + pentru a desemna fiecare dintre alelele de tip sălbatic. Această notație este mai ușor de manipulat, deși necesită o mai bună înțelegere a procedurii de mapare.

Când luăm în considerare trei gene autozomale legate la porumb, încrucișarea experimentală trebuie să îndeplinească aceleași trei criterii pe care le -am stabilit pentru genele legate de cromozomul X la Drosophila *:* (1) unul dintre părinți trebuie să fie heterozigot pentru toate trăsăturile în cauză, (2) genotipurile gametice produse de heterozigoți trebuie să fie evidente atunci când se observă fenotipurile urmașilor și (3) trebuie să avem un eșantion de dimensiuni suficiente pentru a putea finaliza analiza.

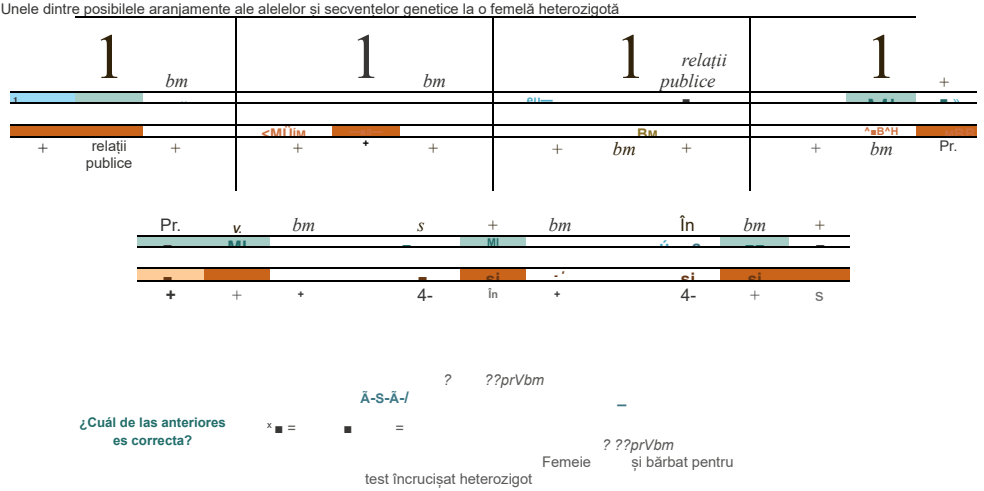
La porumb, genele mutante recesive *bm* (nervură centrală maro *),* Trăsăturile v (mugur *virescent)* și *pr (* aleuronă *purpurie)* sunt legate pe cromozomul 5. Să presupunem că planta femelă este heterozigotă pentru aceste trei trăsături, dar nu cunoaștem: (1) aranjamentul alelelor mutante pe omologii paterni și materni ai acestui individ heterozigot; (2) secvența genei; sau (3) distanțele de hartă dintre gene. Ce genotip trebuie să aibă planta mascul pentru ca maparea să aibă succes? Pentru a îndeplini al doilea criteriu, masculul trebuie să fie homozigot pentru toate cele trei alele mutante recesive. În caz contrar, urmașii din această încrucișare care prezintă un singur fenotip ar putea reprezenta mai mult de un genotip, ceea ce face imposibilă maparea precisă . Rețineți că acest lucru este echivalent cu efectuarea unei încrucișări de testare.

Figura 5.10 ilustrează această încrucișare. După cum se arată, nu cunoaștem nici *aranjamentul alelelor* , nici secvența *loci -urilor.* la femela heterozigotă. Sunt prezentate câteva posibilități, dar nu am stabilit încă care este corectă. De asemenea, nu cunoaștem secvența la masculul patern al încrucișării de testare, așa că trebuie să o atribuim aleatoriu. Rețineți că am ales dacă să plasăm *V* la mijloc. *Acest lucru poate fi sau nu corect.*

Descendenții au fost aranjați în grupuri de câte doi pentru fiecare pereche de clase fenotipice reciproce. Cei doi membri ai fiecărei clase reciproce provin fie din clasa nerecombinante (NR), fie dintr- una dintre cele două recombinări simple posibile (RS) , fie dintr- o încrucișare dublă (DR).

Pentru a rezolva această problemă, utilizați figurile 5.10 și 5.11 atunci când răspundeți la următoarele întrebări:

(a) Unele dintre posibilele aranjamente ale alelelor și secvențelor genetice la o femelă heterozigotă



(b) Rezultatele reale ale unei încrucișări pentru o hartă*

Fenotipurile urmașilor	Număr	Total și procent	Cursuri de schimb valutar
-1- V. *bm* *P'* 4- +	230 237	467 42,1%	Nerecombinat (NR)
+ + *bm* relați V. + i	82 79	161 14,5%	Recombinanți single-uri (RS)
4- V. 4- *relați* *i* 4- *bm*	200 195	395 35,6%	Recombinanți single-uri (RS)
Pr. V. *bm* -1- 4- +	44 42	86 7,8%	De două ori recombinant (DR)

Secvența *pr - v - bm* poate fi sau nu corectă.

FIGURA 5.10 (a) Câteva aranjamente posibile ale alelelor și secvențelor genetice la o femelă heterozigotă. Datele de încrucișare pentru o hartă în trei puncte, prezentate în (b), unde s-a efectuat o încrucișare de test cu femela, oferă baza pentru determinarea care combinație de aranjament și secvență este corectă . *Vezi* Figura 5.11 (d).

1. *Care este aranjamentul heterozigot corect al alelelor la părintele feminin?*

Identificați cele două clase nerecombinante, cele care apar cel mai frecvent. În acest caz, acestea sunt 4-vbm *și pr+* 4- . Prin urmare, aranjamentul alelelor în omologii plantei paterne/femelă trebuie să fie distribuit așa cum se arată în Figura 5.11(a). Acești omologi se segregă în gameți , neafectați de niciun eveniment de recombinare . Orice alt aranjament al alelelor nu ar putea produce clasele nerecombinante observate . (Reamintim că 4 - vbm *este* echivalent cu pr~ vbm și că *pr++* este echivalent cu *Aprbm ').*

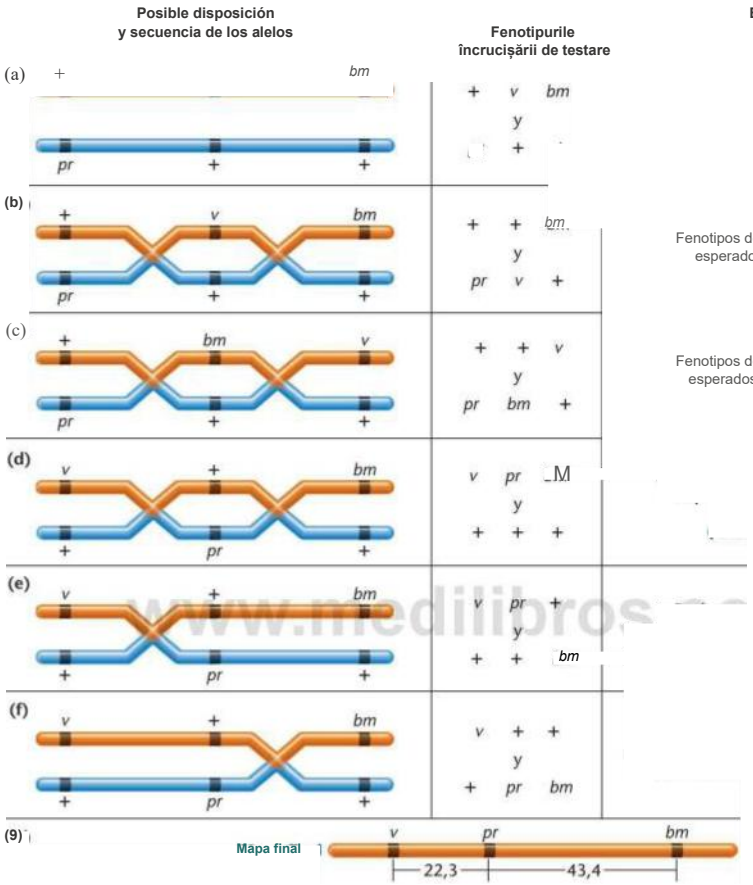

Posible disposición y secuencia de los alelos
Fenotipurile încrucișării de testare
Explicación
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(9)
Mapa final
22,3
43,4
Fenotipurile nerecombinante oferă baza pentru determinarea aranjamentului corect al alelelor pe omologi
Fenotipos doblemente recombinantes esperados si v está en el centro
Fenotipos doblemente recombinantes esperados si bm está en el centro
Fenotipuri
dublu recombinante așteptate dacă pr este în centru
(Aceasta este situația reală.)
Având în vedere că (a) și (d) sunt corecte, fenotipurile recombinante simple sunt produse atunci când schimbul se face între vy pr
Având în vedere că (a) și (d) sunt corecte, fenotipurile recombinante simple sunt produse atunci când schimbul are loc între pr și bm

FIGURA 5.11 Obținerea hărții celor trei gene ale încrucișării din Figura 5.10 , unde nu se cunosc nici aranjamentul alelelor , nici secvența genelor la părintele feminin heterozigot .

2. *Care este ordinea corectă a genelor?*

Pentru a rezolva această întrebare, vom folosi mai întâi abordarea descrisă în Metoda I. Pe baza răspunsului la întrebarea 1, știm că aranjamentul corect al alelelor este

$$\frac{+ \quad v \quad bm}{pr \quad + \quad +}$$

Dar este corectă această secvență genetică? Adică, va produce

un eveniment de dublă încrucișare fenotipurile dublu recombinante observate la fertilizare? *Observațiile arată că nu se va întâmpla acest lucru* [Figura 5.11 (b)]. Încercăm acum celelalte două aranjamente [Figurile 5.11(c) și (d)], *menținând în același timp același aranjament alelic:*

$$\frac{+\quad bmyv+bm}{pr\quad +++pr+}$$

Numai cazul din dreapta va duce la observarea gameților dublu recombinanți [Figura 5.11(d)]. Prin urmare, gena *pr* este localizată în centru.

La aceeași concluzie se ajunge folosind Metoda II pentru a analiza problema. În acest caz, presupunerea unei secvențe genetice nu este necesară. Aranjamentul alelelor la părintele heterozigot este

H- și *bm*
~*pr* + +

Gameții dublu recombinanți sunt, de asemenea, cunoscuți

pr și *bm* și +++

alela *pr este* cea care s-a modificat în raport cu aranjamentul fără încrucișare, asociindu-se cu *v.* și *bm* după o încrucișare dublă. Ultimele două alele (v și *bm)* erau împreună pe un omolog și rămân împreună . Prin urmare, *pr* este gena impară, ca să spunem așa, și se află la mijloc. Astfel, ajungem la același aranjament și secvență ca și în cazul metodei I:

și + *bm*
\+ *pr* +

3. *Care este distanța dintre fiecare pereche de gene?*
După ce am stabilit secvența corectă de loci, *v-pr-bm,* putem acum determina distanța dintre *v* și *pr* și dintre *pr* și *bm.* Reamintim că distanța de pe hartă dintre două gene este calculată luând în considerare toate evenimentele de recombinare detectabile care au avut loc între ele. Aceasta include atât evenimente de recombinare simplă, cât și dublă care implică cele două gene luate în considerare.

Figura 5.11 (e) arată că fenotipurile v pr + și + + *bm* rezultă dintr-o singură încrucișare între *v* și *pr,* iar Figura 5.10 arată că încrucișările simple explică 14,5% din urmași. Adăugând procentul de recombinante dublu (7,8%) la numărul de recombinante simple obținute, calculăm că distanța totală dintre vy *pr* este de 22,3 µm.

Figura 5.11(f) arată că fenotipurile + și + *pr bm* sunt rezultatul unei singure încrucișări între loci-urile pr și bm , totalizând 35,6% conform Figurii 5.10. Prin adăugarea clasei dublu recombinante (7,8%), distanța dintre *pr* și *bm* este de 43,4 µm. Harta finală pentru cele trei gene din acest exemplu este prezentată în Figura 5.11(g).

ACUM REZOLVĂ ASTA

5.3 La *Drosophila, o femelă heterozigotă pentru trăsăturile recesive legate de* cromozomul X *a, b* și *c* a fost încrucișată cu un mascul care a exprimat fenotipic *a, b* și *c.* Descendenții au prezentat următoarele raporturi fenotipice:

+	*b*	*c.*	460
la	+	+	450
la	*b*	*c.*	32
-4-	-k	+	38 de ani
la	-F	*c.*	11
-1-	*b*	4-	9

Nu s - au observat alte fenotipuri .
(a) Care este aranjamentul fenotipic al alelelor acestor gene pe cromozomul X feminin ?
(b) Determinați secvența corectă și construiți o hartă a acestor gene pe cromozomul X.
(c) Ce fenotipuri lipsesc la urmași? De ce?

qué?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică un experiment de mapare în trei puncte în care se observă doar șase categorii fenotipice , deși opt categorii sunt tipice în astfel de încrucișări . Cheia soluției sale constă în a realiza că, dacă distanțele dintre loci sunt relativ mici, dimensiunea eșantionului poate fi prea mică pentru a observa numărul prezis de încrucișări duble, chiar și atunci când se observă perechi reciproce de încrucișări simple . Ar trebui să notați gameții lipsă , să îi clasificați ca încrucișări duble și să utilizați zero ca frecvență a acestora .*

5.4

Pe măsură ce distanța dintre două gene crește, estimările cartografierii devin mai puțin precise.

Până în acest moment, am presupus că frecvențele de încrucișare sunt direct proporționale cu distanța dintre oricare două loci de pe cromozom. Cu toate acestea, nu este întotdeauna posibil să se detecteze toate evenimentele de încrucișare. Un exemplu ar fi atunci când are loc o încrucișare dublă între cele două loci pe care le investigăm. După cum se arată în Figura 5.12(a), dacă are loc o încrucișare dublă , aranjamentul original al alelelor este restabilit pentru fiecare dintre omologii non -surori. Prin urmare , deși a avut loc o încrucișare , aranjamentul original al alelelor nu este întotdeauna prezent în cromozom.

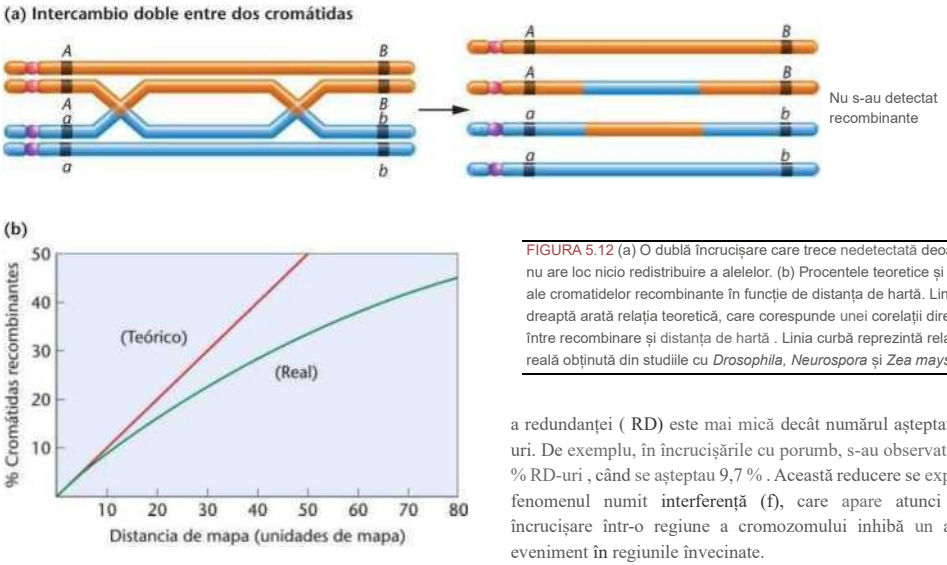


FIGURA 5.12 (a) O dublă încrucișare care trece nedetectată deoarece nu are loc nicio redistribuire a alelelor. (b) Procentele teoretice și reale ale cromatidelor recombinante în funcție de distanța de hartă. Linia dreaptă arată relația teoretică, care corespunde unei corelații directe între recombinare și distanța de hartă . Linia curbă reprezintă relația reală obținută din studiile cu *Drosophila, Neurospora* și *Zea mays*.

Încrucișarea va fi imposibil de detectat. Acest fenomen se va repeta pentru orice număr par de schimburi între două loci.

În plus, din cauza complicațiilor generate de schimburile multicromatidice, determinările hărților tind să subestimeze distanța reală dintre două gene. Cu cât două gene sunt mai departe una de cealaltă, cu atât este mai mare probabilitatea unor încrucișări nedetectate. Deși discrepanța este minimă pentru două gene relativ apropiate, gradul de imprecizie crește odată cu distanța, așa cum se arată în graficul frecvenței de recombinare în funcție de distanța de pe hartă din Figura 5.12(b). Acolo, putem observa că frecvența teoretică, care presupune o corelație directă între recombinare și distanța de pe hartă, diferă de frecvența reală observată pe măsură ce distanța dintre două gene crește. Cele mai precise hărți sunt cele construite din experimente în care genele sunt relativ apropiate.

Interferența și coeficientul de coincidență

După cum ne permite să determinăm o simplă trecere în revistă a legii produsului din Secțiunea 5.3, frecvența așteptată a schimburilor multiple, cum ar fi încrucișările duble, poate fi prezisă odată ce distanța dintre gene este cunoscută. De exemplu, în încrucișarea cu porumb din secțiunea anterioară, distanța dintre vy și *pr* este de 22,3 µm, iar distanța dintre *pr* și *bm* este de 43,4 µm. Dacă cele două încrucișări simple, care fac parte dintr -o încrucișare dublă , apar independent, putem calcula frecvența așteptată a recombinantelor duble (DR_{csp}):

$$DR\text{^}p = (0,223) \times (0,434) = 0,097 = 9,7\%$$

Frecvent, în experimentele de cartografiere, frecvența observată a redundanței (RD) este mai mică decât numărul așteptat de RD-uri. De exemplu, în încrucișările cu porumb, s-au observat doar 7,8 % RD-uri , când se așteptau 9,7 % . Această reducere se explică prin fenomenul numit interferență (f), care apare atunci când o încrucișare într-o regiune a cromozomului inhibă un al doilea eveniment în regiunile învecinate.

Pentru a cuantifica diferențele rezultate din interferență , putem calcula coeficientul de coincidență (C):

$$\_ \text{ DR observat DR așteptat}$$

La trecerea de porumb vom avea

Odată ce C a fost calculat, interferența (7) poate fi cuantificată folosind ecuația simplă:

$$I = 1 — C$$

$$\frac{0,078}{0,097} = 0,804$$

La trecerea de porumb vom avea

$$I - 1.000 - 0,804 = 0,196$$

Dacă interferența este completă și nu se produc recombinante duble , atunci $J = 1,0$. Dacă există mai puține recombinante duble decât se așteptа, I este un număr pozitiv și are loc o interferență pozitivă . Dacă există mai multe recombinante duble decât se aștepta, I este un număr negativ și are loc o interferență negativă . În acest exemplu, I este un număr pozitiv (0,196), indicând faptul că au fost produse cu 19,6% mai puține recombinante duble decât se aștepta .

La eucariote, cel mai frecvent se observă interferența pozitivă . La C. *elegans,* de exemplu, se observă un singur eveniment de crossing-over per cromozom, iar interferența pe fiecare cromozom este completă (C = 1,0). La alte organisme, cu cât genele sunt mai aproape una de cealaltă pe cromozom, cu atât interferența pozitivă este mai mare. Interferența la *Drosophila* este de obicei completă în limitele unei distanțe de 10 unități de hartă . Această observație sugerează că constrângerile fizice care împiedică formarea - chiasmelor apropiate contribuie la interferență. Această interpretare este în concordanță cu faptul că interferența scade atunci când genele sunt mai îndepărtate. În încrucișarea cu porumb ilustrată în Figurile 5.10 și 5.11, cele trei gene sunt relativ îndepărtate una de cealaltă și se observă 80% din recombinantele duble așteptate.

5.5

Genele *Drosophilei* au fost cartografiate pe larg

La organisme precum musca de oțet , porumbul și șoarecele, unde s-a descoperit un număr mare de mutanți și unde se pot efectua încrucișări în scopuri de cartografiere , s-au obținut hărți complete ale fiecărui cromozom . Hărți parțiale ale celor patru cromozomi ai *Drosophila melanogaster* sunt prezentate în Figura 5.13 . S -a observat că practic fiecare trăsătură morfologică a muscii de oțet prezintă mutații. Fiecare locus afectat de mutație este mai întâi - localizat pe unul dintre cei patru cromozomi, sau grupuri de legătură , și apoi cartografiat în raport cu alte gene prezente pe cromozomul respectiv . După cum se poate observa, harta genetică a cromozomului X este ceva mai puțin extinsă decât cea a autosomilor II și III. Comparativ cu aceștі trei, autosomul IV este minuscul. Pe baza dovezilor citologice, s-a constatat că lungimile relative ale hărților genetice se corelează aproximativ cu lungimile fizice relative ale acestor cromozomi.

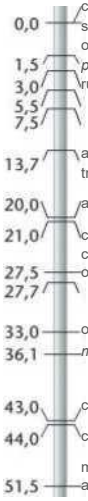
5.6

Analizele de scorare Lod și de hibridizare a celulelor somatice au fost importante din punct de vedere istoric pentru cartografierea cromozomilor umani.

La om , experimentele genetice care implică împerecheri atent planificate și un număr mare de urmași nu sunt nici etice, nici fezabile, așa că studiile timpurii privind linkage-ul au trebuit efectuate prin analiza pedigree-urilor. Aceste studii au încercat să stabilească dacă anumite trăsături erau legate de cromozomul X sau autozomale. Așa cum am stabilit în Capitolul 4, trăsăturile determinate de genele situate pe cromozomul X au ca rezultat pedigree-uri caracteristice; prin urmare, a fost ușor să se identifice astfel de gene. Pentru trăsăturile autozomale , geneticienii au încercat să distingă clar dacă perechile de trăsături prezentau linkage sau erau moștenite independent. Atunci când sunt disponibile pedigree-uri extinse, este posibil să se confirme că genele în cauză sunt strâns legate (adică, rareori separate prin crossing over) prin faptul că cele două trăsături se separă împreună. Această abordare a stabilit legătura dintre genele care codifică antigenul Rh și gena responsabilă pentru fenotipul cunoscut sub numele de eliptocitoză , în care globulele roșii au formă ovală. Se spera că acest tip de observație va permite crearea unei hărți a genelor umane.

Cu toate acestea, dificultățile apar atunci când două gene de interes sunt separate pe un cromozom, astfel încât se formează gameți recombinanți , ascunzând linkage-ul într- un pedigree. În astfel de cazuri, o abordare care utilizează calcule de probabilitate, numită metoda scorului loti, ajută la demonstrarea linkage-ului. Conceput de J.B.S. Haldane și C.A. Smith în 1947 și îmbunătățit de Newton Morton în 1955, scorul *loti* (de la „logaritmul șanselor ") estimează probabilitatea ca un anumit pedigree (sau mai multe pedigree-uri pentru aceleași trăsături de interes), în care sunt - studiate două trăsături, să reflecte linkage-ul. Mai întâi , se calculează probabilitatea ca datele familiale (pedigree) referitoare la două trăsături să fie compatibile cu transmiterea nelegată; adică, trăsăturile par a fi moștenite independent . Se calculează apoi probabilitatea ca date familiale identice pentru aceleași trăsături să rezulte din linkage cu o anumită frecvență de recombinare . Aceste calcule de probabilitate stabilesc pragul de semnificație statistică la valoarea p . 0,05. Apoi se face calculul

I (X) II IV



corp galben și chisturi scutellum, ochi albi sc, ochi fațetați *w , ochi proeminenți fa* , ochi rubinii ec, *rb*

aripi fără vene transversale, cv.

aripi tăiate, ct

chisturi carbonizate, corp *de scorțișoară* , ochi romboizi *, stânga*

ochi vermilion, *aripi miniaturale* , *m*

corp închis la culoare, ochi maronii, *g*

aripi festonate, sd

56.7> cozi răsucite, ochi de bar *, B*

57,0-59.5 vene fuzionate *zx · fu*

6 2,5 ochi de culoarea pielii, *mașină*

66,0^ cote finale, *tb*

68,1V dimensiuni mici. *Dacă*

0,0 *j* antene fără margini, *pentru a*

stelari ai lui 1.3 , S

6.1 — — aripi curbate , *Cy*

13.0 aripi dolofane, *ochi*

16,5 *căprui închis* ,

22,0 -------- cote sternopleural, *Sp*

31,0 tars fuzionat, *d*

36.0 ___ / aripi încrețite, *corr.*

39,3 /fără fiice, *dă*

41.0 -------- aripi comprimate, /

51,0 \ __ / interogări reduse, *rd*

54,5^ _/ochi mov, *pr*

57,5 ochi de cinabru, în

61.0 ^{7x} aripi ofilite, *albe*

67, 0 aripi vestigiale, *de ex.*

72,0 -------- ochi lobați, *L*

75,5 aripi curbate, c globule de grăsime, *adp* ^{7} '^

83,1

vene alare

$^{9°}$,0 \—/ deformat, *dsr*

91,5 ------- abdomen ridat, *mic*

100,5 -------- vene alare suplimentare, *px*

104,5 — ochi căprui, *greutate corporală* 107,0 ^{7} ' pete pe baza aripii, *sp*

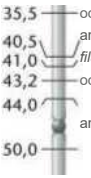
ochi aspri, *vene incomplete* , ochi aspri, *R*

11.0-- femele sterile, *fs(3)C2*

$^{17°}$\J *și*

19.2 -------- ochi căprui închis, *rai quêtas* ascuțit , /v

ochi sepia, corp păros,



ochi și cap mici, aripi înguste,

aripi *unghiulare , arnică filamentoasă* ,

ochi stacojii , *st.*

aripi curbate, *cu*

chete scurte și groase, chete reduse *Sb* , ss

62,0 trident toracic, *dl.*

66,2 vene neregulate , *DI*

69,5 fără cozi, corp de abanos *H* ,

70.7 5 vermilion șchiop gălbui, aripi scurte și

7 4,7 late *cd* , *obt*

ochi de mahon , *mah*

88,0 -------- ochi ridați , supresor *violet* , ochi

91.1 -------- rubinii *su-pr , ca*

95,5-100,7 -------- chisturi mici, *M(3)g*

106.2 --------

0,0 0,2 1.4 2.0 vena aripii 4* întreruptă, *scutelum fără șanț , aripi* curbate, *ochi* reduși

3.0 bărbierit, ochi aspri, *spa*

FIGURA 5.13 Hartă genetică parțială a celor patru cromozomi ai speciei *Drosophila melanogaster.* Cercul de pe fiecare cromozom indică poziția centromerului. Cromozomul I este cromozomul X. Cromozomul IV nu este la scară; adică este relativ mai mic decât este indicat.

Raportul acestor valori de probabilitate este calculat și se determină logaritmul acelei valori, reflectând „probabilitățile" pro sau contra legăturii . În mod tradițional, o valoare de 3,0 sau mai mare este de obicei o indicație puternică a legăturii , în timp ce o valoare de -2,0 sau mai mică este de obicei un argument puternic împotriva legăturii . Valorile între -2,0 și 3,0 nu permit tragerea de concluzii .

Metoda de scorare IOD a reprezentat un progres important în atribuirea genelor umane cromozomilor specifici și în construirea hărților preliminare ale cromozomilor umani. Cu toate acestea,

precizia sa este limitată de amploarea genealogiei, iar rezultatele inițiale au fost descurajante, atât din cauza acestei limitări, cât și din cauza numărului relativ mare de cromozomi haploizi umani (23). Până în 1960, erau disponibile foarte puține informații despre linkage-ul autozomal. Astăzi, însă, spre deosebire de impactul limitat pe care l-a avut când a fost dezvoltată inițial, această tehnică elegantă a devenit importantă în analiza linkage-ului la oameni, datorită descoperirii a nenumărați markeri moleculari *ADN* pe fiecare cromozom uman. Descoperirea acestor markeri, care se comportă ca genele prin faptul că ocupă un locus specific pe un cromozom , a fost rezultatul tehnicilor ADN recombinant (Capitolul 20) și al analizei genomice (Capitolul 21). Acum, linkage-ul oricărei trăsături din specia umană poate fi verificat datorită unor astfel de markeri. Vom discuta din nou despre markerii ADN în Secțiunea 5.7.

În anii 1960, o nouă tehnică, hibridizarea celulelor somatice, s-a dovedit extrem de utilă în atribuirea genelor umane cromozomilor corespunzători . Această tehnică, descoperită de Georges Barsky, se bazează pe faptul că două celule dintr-o cultură de țesuturi pot fi induse să fuzioneze , formând o celulă hibridă. Barsky a folosit două linii celulare de șoarece, dar în curând a devenit clar că și celulele din organisme diferite pot fuziona. Când se întâmplă acest lucru, se produce un tip inițial de celulă numit heterocarion. Celula hibridă are doi nuclei cu o citoplasmă comună. Folosind tehnici adecvate, este posibilă fuzionarea, de exemplu, a celulelor umane și de șoarece și separarea hibrizilor de celulele-mamă.

Când este cultivat *in vitro* În heterocarioni, au loc două schimbări interesante . Nucleii fuzionează în cele din urmă , dând naștere unui sincarion. Apoi, când cultura continuă timp de mai multe generații, cromozomii de la una dintre cele două specii parentale se pierd treptat. În cazul hibridului om -șoarece, cromozomii umani se pierd aleatoriu până când , în final, sincarionul are un set complet de cromozomi de șoarece și doar câțiva cromozomi umani. Această pierdere preferențială a cromozomilor umani , mai degrabă decât a cromozomilor de șoarece, face posibilă atribuirea genelor umane cromozomilor pe care acestea se află .

Logica experimentală este simplă. De exemplu, dacă un produs genetic uman specific este sintetizat într- un sincarion cu trei cromozomi umani, atunci gena responsabilă pentru acel produs trebuie să fie localizată pe unul dintre acești trei cromozomi rămași în celula hibridă . Invers, dacă produsul genetic uman nu este găsit , gena responsabilă nu poate fi prezentă pe niciunul dintre cei trei cromozomi umani rămași . În mod ideal, un grup de 23 de linii celulare hibride, fiecare cu un cromozom uman diferit , ar permite atribuirea imediată a oricărei gene umane unui cromozom specific pentru care produsul ar putea fi caracterizat .

În practică, ceea ce se utilizează cel mai des este un panel de linii celulare , fiecare cu mai mulți cromozomi umani . Corelația dintre prezența sau absența fiecărui cromozom cu prezența sau absența fiecărui produs genetic se numește test de sintenie. Să luăm în considerare, de exemplu, datele ipotetice furnizate în Figura 5.14, unde patru produse genetice (A, B, C și D) sunt testate pe opt cromozomi umani . Să analizăm cu atenție rezultatele pentru a localiza gena care produce produsul A :

1. Produsul A nu este produs în linia celulară 23, iar cromozomii 1, 2 , 3 și 4 sunt prezenți în acea linie celulară . Prin urmare , putem exclude prezența genei A în acești patru cromozomi și concluziona că aceasta trebuie să fie pe cromozomii 5, 6 , 7 sau 8 .
2. Produsul A este produs în linia celulară 34, care conține cromozomii 5 și 6, dar nu și

Líneas celulares híbridas	Cromosomas humanos presentes								Productos génicos que se expresan			
	1	2	3	4	5	6	*	8	A	B	C	D
23									-	+	-	+
34									+	-	-	+
41									+	+	-	+

FIGURA 5.14 Parrilla de datos hipotéticos utilizada en una prueba de sintenia para asignar genes a sus correspondientes cromosomas humanos. Se comprueban tres líneas celulares híbridas somáticas, denominadas 23, 34 y 41, para determinar la presencia o ausencia de los cromosomas humanos 1 a 8, así como su capacidad para producir los productos génicos humanos hipotéceos A, B, C y D.

pe 7 și 8. Prin urmare, gena *A* trebuie să fie pe cromozomii 5 sau 6, dar nu pe 7 sau 8, deoarece aceștia sunt absenți, chiar dacă produsul A este produs.

3. Produsul A este produs și în linia celulară 41, care are cromozomul 5 , dar nu și cromozomul 6. Prin urmare, conform acestei analize, gena A se află pe cromozomul 5.

Folosind o logică similară, gena *B* poate fi atribuită cromozomului 3. Efectuați singur această analiză pentru a demonstra că acest raționament este corect.

Gena C prezintă o situație specială. Datele indică faptul că nu este prezentă pe cromozomii 1-7. Deși ar putea fi pe cromozomul 8, nu există dovezi directe care să susțină această concluzie. Sunt necesare panouri suplimentare. Vă vom lăsa cu gena *D.* pentru analiză. Pe ce cromozom se află?

descrisă mai sus, cercetătorii au reușit să atribuie literalmente sute de gene umane unui cromozom sau altuia. Pentru a cartografia gene ale căror produse nu sunt încă cunoscute, cercetătorii au trebuit să se bazeze pe alte abordări. De exemplu, a fost posibil să se atribuie genele responsabile de boala Huntington , fibroza chistică și neurofibromatoza cromozomilor 4, 7 și 17 respectivi, prin combinarea tehnologiei ADN-ului recombinant cu analiza pedigree . Analiza genomică modernă ne-a extins cunoștințele despre cartografierea nenumăratelor alte trăsături umane , așa cum este descris în secțiunea următoare.

Cartografierea cromozomilor este acum posibilă folosind markeri ADN și baze de date adnotate

Deși metodele tradiționale bazate pe analiza recombinării au produs hărți cromozomiale detaliate la diverse organisme, obținerea unor astfel de hărți la alte organisme (inclusiv la oameni) care nu sunt potrivite pentru astfel de studii este extrem de limitată. Din fericire, dezvoltarea tehnologiilor care permit analiza directă a ADN-ului a îmbunătățit considerabil cartografierea genelor la aceste organisme. Vom discuta acest subiect folosind specia umană ca exemplu.

Progresul s-a bazat inițial pe descoperirea markerilor ADN (menționați anterior) identificați în timpul studiilor de ADN recombinant și genomice. Acești markeri sunt segmente scurte de ADN a căror secvență și locație sunt cunoscute, ceea ce îi face repere utile *în scopuri* de cartografiere . Analizarea genelor umane în raport cu acești markeri ne-a extins înțelegerea asupra localizării nenumăratelor gene din cadrul genomului, acesta fiind scopul final al cartografierii cromozomilor.

Primele exemple studiate au fost markerii ADN numiți polimorfisme de lungime a fragmentelor de restricție (RFLP *) (vezi* Capitolul 22) și microsateliții *(vezi* Capitolul 12). RFLP-urile sunt situsuri polimorfice care sunt generate atunci când anumite secvențe specifice de ADN sunt recunoscute și tăiate de enzimele de restricție. Microsateliții sunt secvențe scurte, repetitive, care pot fi găsite în tot genomul și variază în numărul de repetiții la fiecare situs specific . De exemplu, secvența CA de două nucleotide se repetă între 5 și 50 de ori la fiecare situs $[(CA)_n]$ și apare în tot genomul, în medie, aproximativ la fiecare 10.000 de baze. Microsateliții pot fi identificați nu numai după numărul de repetiții, ci și după secvențele de ADN care îi flanchează. Mai recent , au început să fie utilizați polimorfisme cu un singur nucleotid (SNP). Distribuite în tot genomul, până la câteva milioane dintre aceste variații pot fi analizate pentru a căuta o asociere cu o boală sau o trăsătură de interes, oferind astfel geneticienilor un mijloc de identificare și localizare a genelor înrudite.

Fibroza chistică este unul dintre primele exemple de genă localizată folosind markeri ADN. Este o boală exocrină autosomal recesivă care scurtează speranța de viață și provoacă producerea unui mucus foarte gros și abundent, care afectează funcția unor organe precum plămânii și pancreasul . După ce oamenii de știință au stabilit că gena responsabilă pentru această boală este localizată pe cromozomul 7, au reușit să identifice locația exactă a acesteia pe brațul lung (brațul q) al acelui cromozom.

a fost stabilită asocierea dintre 24 de locații genomice și șapte boli umane comune , utilizând SNP-uri ca markeri ADN: *diabetul de tip 1* (insulinodependent) și *diabetul de tip 2* . *Boala Crohn* (boala inflamatorie intestinală), *hipertensiunea arterială,* cardiopatia ischemică , *tulburarea bipolară* (boala maniaco-depresivă) și *artrita reumatoidă.* În fiecare caz, a fost posibil să se atribuie un efect al susceptibilității lor moștenite unei locații specifice dintr-un anumit cromozom al genomului. În unele cazuri, acest lucru a permis confirmarea sau a condus direct la identificarea unei gene specifice implicate în originea bolii

. În alte cazuri, noi gene vor fi descoperite, fără îndoială, ca urmare a identificării locației lor. Vom reveni asupra acestui subiect mult mai detaliat în capitolele 21 și 22.

Numeroasele baze de date ale Proiectului Genomului Uman - care au fost finalizate până în prezent fac posibilă acum - cartografierea genelor de pe un cromozom uman prin distanțe măsurate în perechi de baze, mai degrabă decât prin frecvența de recombinare. Aceasta este diferența dintre ceea ce se numește *o hartă fizică* a genomului și *hărțile genetice* descrise anterior. Cu această abordare, se pot determina distanțele relative față de alte gene și caracteristici, cum ar fi markerii ADN pe care i- am discutat deja . Geneticienii vor putea în curând să construiască hărți cromozomiale ale indivizilor care să arate combinațiile specifice de alele la fiecare locus genetic.

5.8

Încrucișarea implică un schimb fizic între cromatide

Odată ce tehnicile de cartografiere genetică au fost dezvoltate, acestea au fost utilizate pentru a studia relația dintre chiasmele observate în timpul profazei I a meiozei și crossing-over. De exemplu, sunt chiasmele manifestări vizibile ale evenimentelor de recombinare? Dacă da, atunci crossing-over-ul la organismele superioare pare a fi rezultatul unui schimb fizic real între cromozomii omologi. Acest lucru a fost demonstrat independent în anii 1930 de Harriet Creighton și Barbara McClintock în *Zea mays* (porumb) și de Curt Stern în *Drosophila.*

Întrucât experimentele sunt similare, vom lua în considerare doar *unul* dintre ele , cel efectuat pe porumb. Creighton și McClintock au studiat două gene legate pe cromozomul 9 al porumbului. La un locus, alelele incolore (c) și *colorate* (C) (colorat) controlează colorarea endospermului (endosperma este țesutul nutritiv conținut în boabele de porumb). La celălalt locus, alelele *amidonice (Wx)* (amidonoase) și *ceroase (wx)* (ceroase) controlează caracteristicile carbohidraților din endosperm. Planta de porumb studiată a fost heterozigotă pentru ambele locusuri. Cheia acestui experiment a fost că unul dintre omologi avea doi markeri citologici speciali. Markerii constau dintr-o proeminență puternic colorată la un capăt al cromozomului și o porțiune translocată a unui alt cromozom (8) la celălalt capăt . Aranjamentul acestor alele și markeri a putut fi detectat prin mijloace citologice și este prezentat în Figura 5.15.

Creighton și McClintock au încrucișat această plantă cu o altă homozigotă pentru alela *incoloră (* c) și heterozigotă pentru *alelele ceroase/amidonoase.* Au obținut o gamă de fenotipuri distincte în rândul urmașilor, dar cel mai interesant a fost cel rezultat din încrucișarea între cromozomi și markeri citologici distinctivi. Au examinat cromozomii acestei plante, cu fenotipul incolor și ceros (cazul I din Figura 5.15), căutând markerii citologici. Dacă încrucișarea genetică este însoțită de un schimb fizic între omologi, cromozomul translocat va fi în continuare prezent , dar umflarea nu va fi. Asta au observat ! La o a doua plantă (cazul II), fenotipul colorat și amidonos a trebuit să fie obținut atât din gameți nerecombinați , cât și din evenimente de încrucișare. Prin urmare, unele dintre cazuri ar trebui să conțină cromozomi cu umflare, dar fără cromozomul translocat. Acest lucru a fost, de asemenea, observat și, din nou , dovezile au susținut concluzia că a avut loc un schimb fizic . Împreună

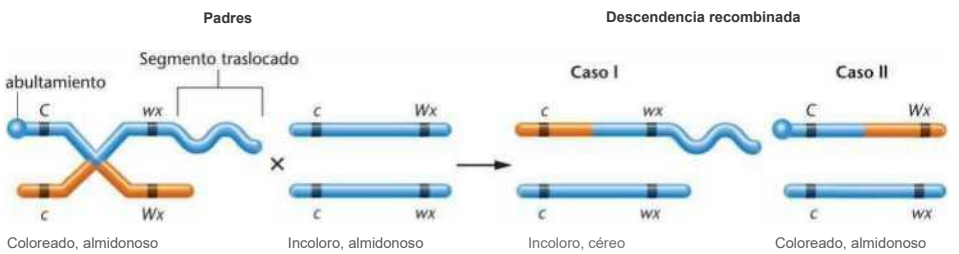


FIGURA 5.15 Fenotipos y estructura de los cromosomas de los padres y de los descendientes recombinantes, del experimento de Creighton y McClintock en el maíz. El abultamiento y el segmento translocado sirven de marcadores citológicos para establecer que el entrecruzamiento implica un intercambio real entre los brazos cromosómicos.

cu descoperirile lui Curt Stern la *Drosophila,* această lucrare a stabilit clar că încrucișarea are o bază citologică.

După ce am introdus subiectele structurii chimice și replicării ADN-ului (Capitolele 10 și 11), vom reveni la subiectul crossing-over-ului în Capitolul 11 pentru a examina modul în care are loc ruperea și reunirea lanțurilor de ADN care alcătuiesc cromatidele. Această discuție va oferi o mai bună înțelegere a recombinării genetice.

5.9

Schimburile au loc și între cromatidele surori

Știind că încrucișarea are loc între cromozomii omologi în sinapsă în timpul meiozei, ne-am putea întreba dacă un astfel de schimb fizic are loc între cromatidele surori care sunt aliniate în timpul mitozei. Fiecare cromozom individual în profază și metafaza mitozei este compus din două cromatide surori identice, unite printr -un centromer comun. O serie de experimente au arătat că schimburi reciproce similare cu încrucișarea au loc într-adevăr între cromatidele surori. Deși aceste schimburi de cromatide surori (SCH) nu au ca rezultat noi combinații alelice , dovezile din ce în ce mai numeroase sugerează că aceste evenimente sunt extrem de semnificative.

Identificarea și studiul evenimentelor de schimb de cromatide surori (SCH) sunt facilitate de mai multe tehnici moderne de colorare. Într-o tehnică particulară, celulele sunt lăsate să se replice timp de două generații în prezența bromodeoxiuridinei (BrdU), un analog al timidinei . După două runde de replicare, fiecare pereche de cromatide surori are un membru cu o catenă de ADN „marcată" cu BrdU, în timp ce celălalt membru are ambele catene marcate cu BrdU. Folosind colorarea diferențială, cromatidele cu analogul pe ambele catene se colorează *mai puțin intens* decât cromatidele care au BrdU pe o singură catenă. Drept urmare , orice eveniment SCH este ușor detectabil. Numeroase instanțe de schimb de cromatide surori sunt clar vizibile în Figura 5.16 . Datorită modelului alternant neuniform pe care îl prezintă, aceste cromatide surori sunt adesea numite cromozomi arlechin.

Deși semnificația HIC este încă neclară, mai multe observații au generat un interes considerabil în acest fenomen. De exemplu, știm că agenții care induc leziuni cromozomiale (cum ar fi virusurile, razele X, lumina ultravioletă și anumiți mutageni chimici) cresc, de asemenea, frecvența HIC. În plus, frecvența este crescută în acest sindrom .

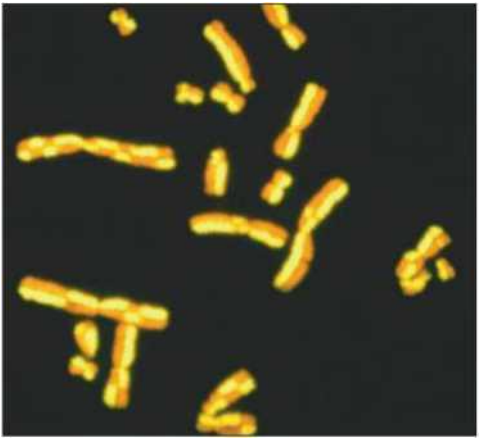


FIGURA 5.16 Demonstrație a schimbului de cromatide surori (SCH) în cromozomii mitotici. Uneori numiți cromozomi arlechin datorită modelului alternant pe care îl prezintă, cromatidele surori care conțin analogul de timidină BrdU par să aibă o fluorescență *mai redusă* . Cromozomii au fost mai strălucitori atunci când conțineau analogul în ambele catene de ADN decât atunci când îl conțineau doar într -una . Acești cromozomi au fost colorați cu colorantul Hoechst 33258 și portocaliu de acridină, și apoi observați cu un microscop cu fluorescență .

Sindromul Bloom, o boală umană cauzată de o mutație a genei *BLM* al cromozomului 15. Această afecțiune recesivă rară, ereditară , este caracterizată prin retard de creștere prenatală și postnatală , sensibilitate extremă a pielii feței la lumina soarelui, imunodeficiență, predispoziție la tumori benigne și maligne și modele comportamentale anormale . Cromozomii din culturile de leucocite , celulele măduvei osoase și fibroblastele derivate de la indivizi homozigoți sunt foarte fragili și instabili în comparație cu cei derivați de la indivizi homozigoți și heterozigoți normali . Se observă o creștere a ruperii și rearanjării între cromozomii neomologi, împreună cu un schimb excesiv de cromatide surori. Lucrările lui James German și ale mai multor colegi sugerează că gena BLM codifică *o* enzimă numită ADN helicază, care este cel mai bine cunoscută pentru rolul său în replicarea ADN- ului (*vezi* Capitolul 11).

Mecanismele de schimb între cromozomii neomologi și între cromatidele surori pot avea caracteristici comune, deoarece frecvența ambelor crește substanțial la

indivizii cu tulburări genetice . Aceste -
fapte sugerează că un studiu
amănunțit al schimbului de cromatide
surori poate contribui la

o mai bună înțelegere a mecanismului de recombinare și a stabilității relative a cromozomilor normali și anormali genetic. Vom găsi o altă demonstrație a ICH în Capitolul 11 , când vom lua în considerare replicarea ADN-ului *(vezi* Figura 11.5).

5.10

În organismele haploide, se poate efectua analiza legăturilor și cartografierea.

Acum ne vom îndrepta către o altă extindere a studiului nostru privind genetica transmiterii: analiza linkage-ului și cartografierea cromozomilor la *eucariotele haploide.* După cum vom vedea, deși analiza localizării genelor în genomul organismelor haploide poate părea ceva mai complicată decât la organismele diploide, principiile de bază sunt aceleași. De fapt, multe principii de bază ale moștenirii au fost stabilite prin studiul fungilor haploide.

Multe eucariote unicelulare sunt haploide în timpul stadiilor vegetative ale ciclului lor de viață. Alga *Chlamydomonas* și mucegaiul *Neurospora* posedă această condiție genetică. Aceste organisme formează celule reproducătoare care fuzionează în timpul fertilizării, formând un zigot diploid; cu toate acestea, zigotul suferă curând meioză , restabilind haploidia . Produșii meiotici haploizi sunt progenitorii membrilor ulteriori ai fazei vegetative a ciclului de viață . Figura 5.17 ilustrează acest tip de ciclu la alga verde *Chlamydomonas* . Chiar dacă celulele haploide care fuzionează în timpul fertilizării par identice (și, prin urmare, sunt numite izogameți), diferențele chimice de pe suprafața lor permit clasificarea lor în două tipuri distincte. Prin urmare, toate tulpinile sunt fie „+ " , *fie* „- ", iar fertilizarea are loc numai între celule diferite .

Pentru a efectua experimente genetice cu organisme haploide, cercetătorii izolează tulpini de genotipuri diferite și le încrucișează. După fertilizare și meioză , produșii meiotici rămân împreună și pot fi analizați. Acesta este cazul Chlamydomonas sau al ciupercii

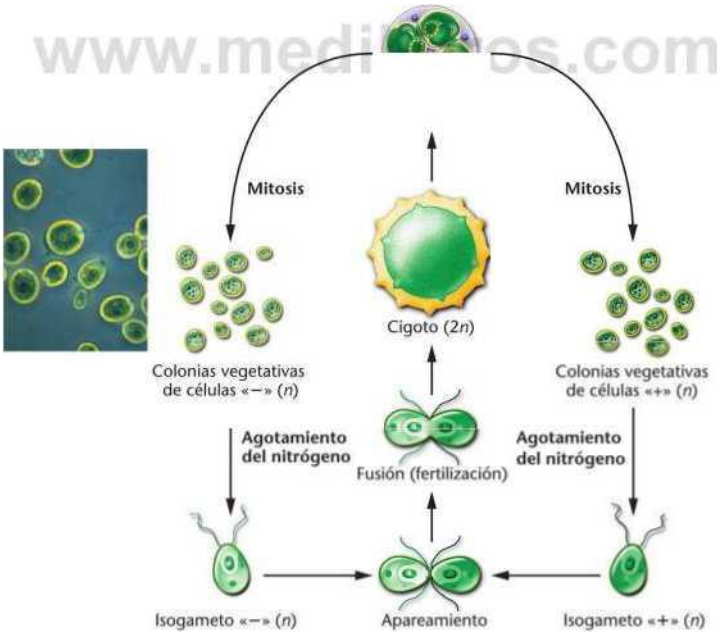


FIGURA 5.17 Ciclo biológico de *Chlamydomonas.* El cigoto diploide (en el centro) sufre meiosis, dando lugar a células haploides «+»o v-»que sufren mitosis, produciendo colonias vegetativas. Las condiciones desfavorables estimulan la formación de isogametos, que se fusionan en la fecundación, produciendo un cigoto que repite el ciclo. En la fotografía se muestran colonias vegetativas.

Neurospora, pe care o vom folosi ca exemplu în discuția următoare. La *Neurospora,* după fertilizare (Figura 5.18), *meioza* are loc într-o structură asemănătoare unui sac numită asea , iar grupul inițial de produși haploizi, numit tetradă, rămâne în interior . *Termenul tetradă are aici un înțeles complet diferit de cel folosit pentru a descrie configurația cromozomilor cu patru catene, caracteristică profazei I a meiozei la diploide.*

În *Neurospora,* după meioză, fiecare celulă a aseei se divide prin mitoză, rezultând opt ascospori haploizi . Aceștia pot fi disecați și examinați morfologic sau testați pentru a le determina genotipurile și fenotipurile. Deoarece aranjamentul celor opt celule reflectă secvența *formării* lor după meioză, se spune că tetrada este „ordonată" și putem efectua o *analiză ordonată a tetradelor* . Acest proces este esențial pentru următoarele subiecte pe care le vom aborda.

Harta genei-centromerului

Când se analizează modelul de ascospori pentru o singură pereche de alele (a/ +) în *Neurospora,* așa cum este ilustrat în Figura 5.19, datele pot fi utilizate pentru a calcula distanța de hartă dintre locusul genei respective și centromer. Acest proces este uneori numit mapare a centromerului. Se realizează prin determinarea experimentală a frecvenței de recombinare folosind date tetradice . Observați în Figura 5.19 că, după ce s-au format cei patru produși meiotici ai tetradei , are loc diviziunea mitotică , rezultând opt produși ordonați (ascospori). Dacă nu există nicio încrucișare între gena din

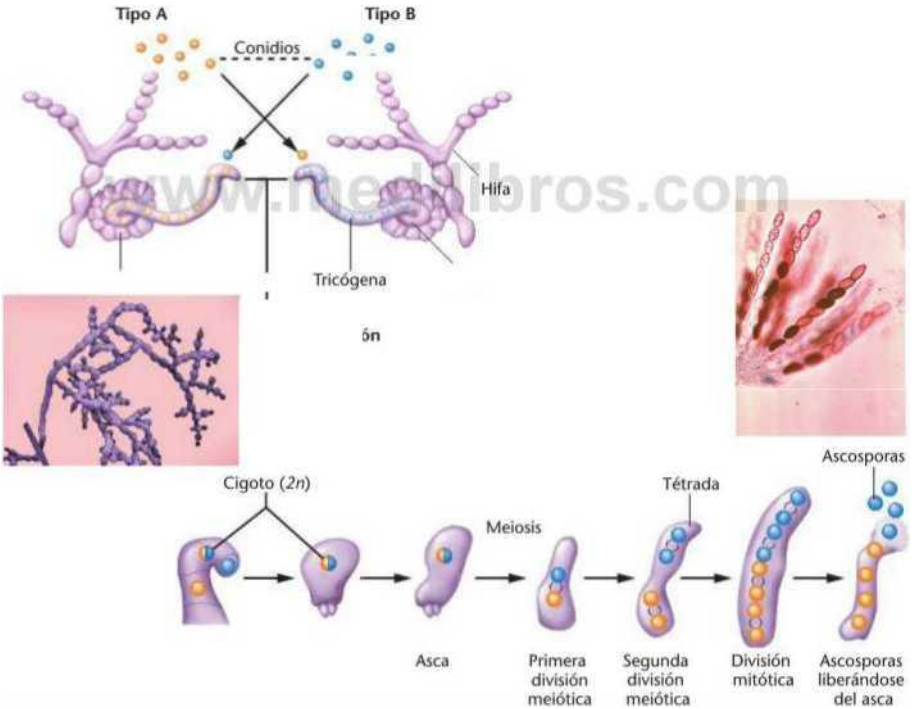
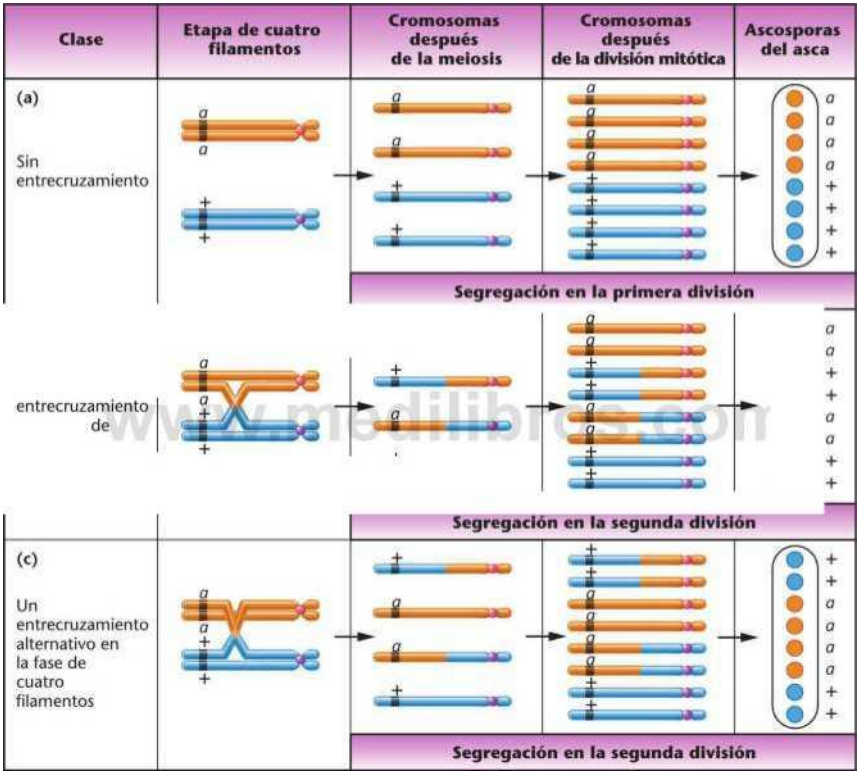


FIGURA S.18 În ciclul de viață al *Neurospora,* reproducerea sexuată începe după fuziunea conidiilor (sporilor asexuați) de tipuri de împerechere opuse. După fertilizare, fiecare zigot diploid este închis într-un ascospor, unde are loc meioza , rezultând patru celule haploide, câte două din fiecare tip de împerechere. Apoi are loc diviziunea mitotică, iar opt ascospori haploizi sunt eliberați ulterior. După germinare, ciclul poate fi repetat. Fotografiile arată stadiile vegetative ale organismului și mai mulți ascospori care se pot forma în cadrul unei singure structuri, chiar dacă am prezentat ce se întâmplă în cadrul unui singur ascospor.



www.medilibros.com

FIGURA 5.19 Trei moduri în care pot fi generate diferite modele de ascospori în *Neurospora.* Analiza acestor modele poate servi drept bază pentru cartografierea genei-centromer. Fotografia prezintă o serie de aranjamente de ascospori în cadrul ascosporilor din *Neurospora.*

studiu și centromer, modelul ascosporilor (care se găsesc într-o asea) apare așa cum se arată în Figura 5.19(a) *(aaaa + + + +) †.*

Acest model reprezintă segregarea la prima diviziune , deoarece cele două alele se separă în prima diviziune meiotică. Cu toate acestea, încrucișarea va modifica acest model , așa cum se arată în Figurile 5.19(b)(aít + + ati + +) și 5.19 (c)(4- 4- *aaa* 4- 4-). Pot apărea și alte două modele de recombinare , în funcție de orientarea cromatidelor în a doua diviziune meiotică: (+ + aa+ 4- *aa)* și *(aa* 4- 4- 4- 4- *aa).* Cele patru modele, care apar din încrucișarea dintre gena *α* și centromer , reflectă segregarea în timpul celei de -a doua diviziuni, deoarece

†Modelul (++++aaaa) poate fi, de asemenea, format, dar este imposibil de distins de modelul (aaaa++++).

Distanța (<7) reflectă procentul de recombinare și reprezintă doar jumătate din numărul de cromatide care se segregă în a doua diviziune. Acest lucru se datorează faptului că încrucișarea are loc la fiecare patru cromatide.

De exemplu, să presupunem că *„a"* reprezintă albinosul și „+" tipul sălbatic din *Neurospora.* În încrucișările dintre cele două tipuri genetice, să presupunem că s-au observat următoarele date:

65 de jucători segregați în prima divizie

70 de segregați în divizia a doua

Prin urmare, distanța dintre a și centromer este:

$$d' = \frac{(l/2)(70)}{5} = 0{,}259 \text{ X } 100 = 25{,}9 \text{ sau aproximativ } 26 \text{ um.}$$

Pe măsură ce distanța crește la 50 de unități, în teorie toate asimilările ar trebui să rezulte din segregarea la a doua diviziune. Cu toate acestea, numeroși factori împiedică acest lucru . Ca și în cazul organismelor diploide, precizia este mai mare atunci când gena și centromerul sunt relativ apropiate.

După cum vom vedea în secțiunea următoare, putem analiza și organismele haploide pentru a distinge între linkage și asortiment independent a două gene. Distanțele de pe hartă dintre loci-urile genetice sunt calculate odată ce linkage-ul a fost stabilit. Prin urmare, acum...

cele două alele nu se separă decât la a doua diviziune meiotică. Deoarece diviziunea mitotică pur și simplu duplică modelele (crescând de la 4 la 8 ascospori), datele tetradelor ordonate sunt de obicei abreviate pentru a reflecta genotipurile celor patru perechi de ascospori, cu șase combinații diferite posibile.

Segregarea în prima divizie

(1) sau la ++

(2) + + către o

Segregarea în a doua divizie

(3) tu + la +

(4) 1 la + d

(5) + la d +

(6) la + + la

Pentru a calcula distanța dintre genă și centromer, trebuie obținute date de la un număr mare de animale în încrucișări controlate. Folosind aceste date, se calculează distanța (d):

l/2 (ascii care secretă în a doua diviziune) are hărți detaliate ale unor organisme precum *Saccharomyces, Neurospora* și *Chlamydomonas.*

total de aseas contadas

Analiza tetradelor ordonate și dezordonat

una de ellas se ha dado en la meiosis solo entre dos de las

În discuția anterioară, am presupus că este posibil să se determine genotipul fiecărui ascospor și poziția sa în cadrul tetradei . Pentru a efectua o astfel de analiză a tetradelor ordonate, fiecare ascospor trebuie disecat și, odată germinat, examinat. Acesta este un proces anevoios, dar este esențial pentru două tipuri de analiză:

1. Pentru a distinge între segregarea în prima și a doua diviziune a alelelor în meioză.
2. evenimentele de recombinare sunt reciproce sau nu. Astfel de informații sunt esențiale pentru „cartografierea centromerului", așa cum tocmai am explicat . Prin urmare, trebuie efectuată o analiză ordonată a tetradelor pentru a determina distanța dintre genă și centromer.

Analiza tetradelor ordonate a relevat că recombinarea nu este întotdeauna reciprocă, în special atunci când genele studiate sunt strâns legate . Această observație a condus la investigarea fenomenului numit *conversie genică.* Deoarece studiul său necesită cunoașterea structurii și analizei ADN-ului, vom reveni asupra acestui subiect în Capitolul 11.

Mult mai puțin plictisitoare decât analiza tetradelor ordonate - este izolarea ascosporilor individuali, permiterea lor să se maturizeze și apoi determinarea genotipurilor fiecărui ascospor, dar nu într -o ordine specifică. Aceasta se numește analiză tetradelor - dezordonate . După cum vom vedea în secțiunea următoare, o astfel de analiză poate fi utilizată pentru a determina dacă două gene sunt legate pe același cromozom și, dacă da, pentru a determina distanța pe hartă dintre ele.

Legătura și maparea

Analiza datelor genetice derivate de la organismele haploide poate fi utilizată pentru a distinge între linkage și asortimentul independent a două gene; de asemenea , permite calcularea distanțelor de pe hartă dintre loci odată ce linkage-ul a fost stabilit. În discuția următoare, vom lua în considerare analiza tetradelor din alga Chlamydomonas . Cu excepția faptului că cele patru produse *meiotice* nu sunt ordonate și că *nu* suferă diviziune mitotică după finalizarea meiozei , se aplică principiile generale stabilite pentru *Neurospora* . Se aplică și la *Chlamydomonas.*

Pentru a compara asortimentul independent și linkage-ul , vom lua în considerare două alele mutante, *o* și *b,* care reprezintă două loci diferite de *Chlamydomonas.* Să presupunem

că 100 de tetrade derivate din încrucișarea *ab* X + + produc datele tetradice prezentate în Tabelul 5.1. După cum se poate observa, toate tetradele produc unul dintre cele trei modele. De exemplu, toate tetradele de clasa I produc două celule + + și două *celule ab și sunt* numite ditipuri paterne (P). Tetradele de clasa II produc două celule a+ și două celule +b și sunt numite ditipuri non-paterne (NP). Tetradele de clasa III produc patru celule, fiecare dintre acestea având unul dintre cele patru genotipuri posibile și, prin urmare, sunt numite tetratipuri (T).

Aceste date susțin ipoteza că genele reprezentate de alelele a *și b* sunt situate pe cromozomi diferiți. Pentru a înțelege de ce, trebuie să ne referim la Figura 5.20. Părțile (a) și (b) ale acelei figuri arată originea ditipurilor paterne (P) și non-paterne (NP) pentru două gene nelegate. Conform principiului mendelian al asortării independente a genelor nelegate, aceasta

Ne așteptăm la proporții aproximativ egale ale acestor două tipuri de tetrade. Astfel, atunci când există un număr egal de ditipuri paterne și non-paterne, cele două gene nu sunt legate. Datele din Tabelul 5.1 confirmă această predicție. Deoarece a avut loc o segregare independentă, putem concluziona că cele două gene sunt situate pe cromozomi diferiți.

Analiza tétradelor de *Chlamydomonas*

Clasa	I	II	III
TABLA S.1 adă Paternă (P) Fără paternă (NP) Tetratipos (T)			
Genotipuri	+ +	*un* +	+ +
prezent	4- + *din*	*un* + + ó	*un* + + *b*
	din	+ *b*	*din*
Număr de tetrade		43	14

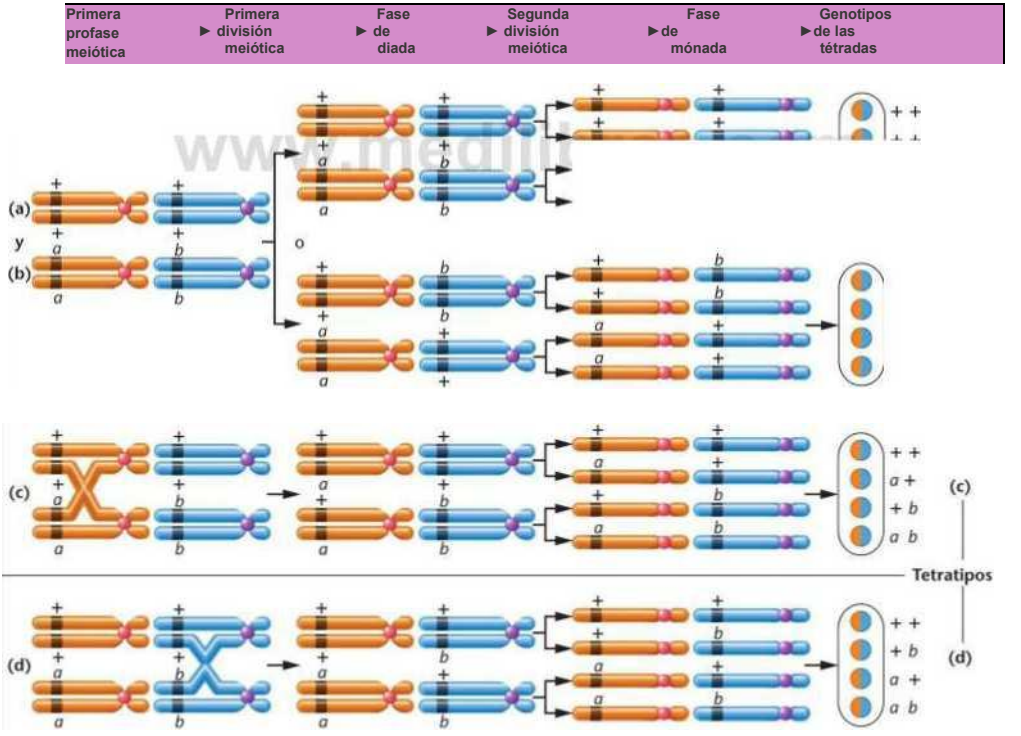


FIGURA 5.20 Origen de los distintos genotipos que se encuentran en tétradas de *Chlamydomonas* cuando se consideran dos genes localizados en cromosomas distintos.

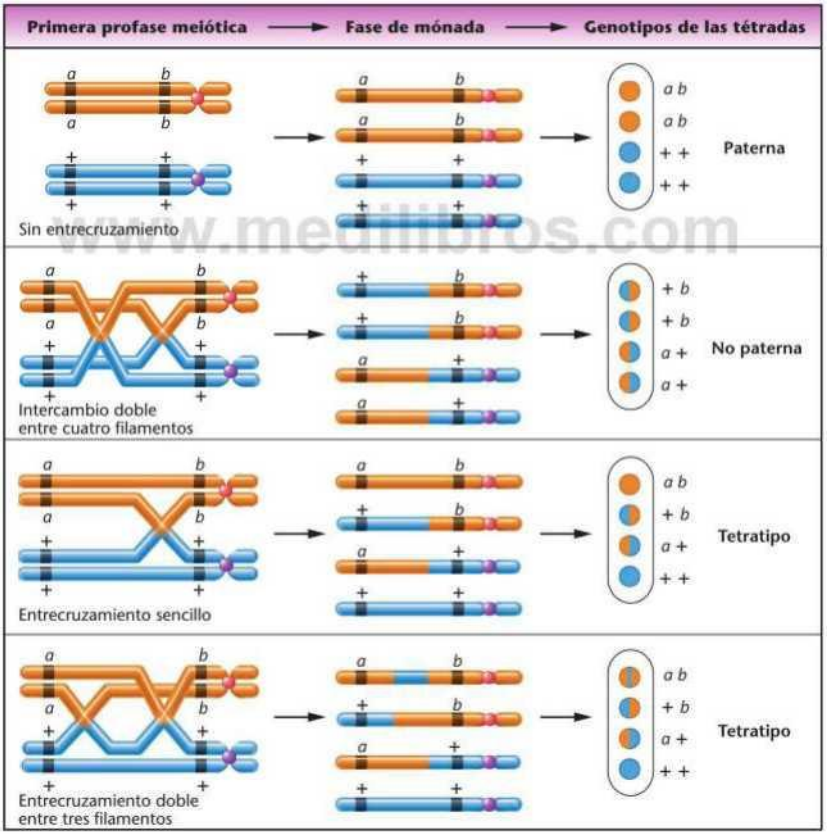
Originea clasei III, tetratipurile, este prezentată în Figura 5.20 (c,d). Genotipurile tetradelor din această clasă pot proveni în două moduri posibile. Ambele implică încrucișarea între una dintre gene și centromer. În Figura 5.20(c), schimbul implică unul dintre cei doi cromozomi și are loc între gena a și centromer; în Figura 5.20(d), este implicat celălalt cromozom, iar schimbul are loc între gena *b* și centromer.

Producerea de tetratipuri nu modifică raportul final al celor patru genotipuri prezente în toate produsele meiotice. Dacă se analizează genotipurile a 100 de tetrade (care produc 400 de celule), se găsesc 100 din fiecare genotip. Acest raport 1:1:1:1 este cel prezis conform principiului segregației independente.

Să luăm acum în considerare cazul în care genele *a* și *b* sunt legate (Figura 5.21). Se vor produce aceleași tipuri de tetrade. Cu toate acestea, ditipurile paterne și non- paternale nu vor apărea neapărat în aceeași proporție; nici cele patru combinații genotipice nu vor fi găsite în număr egal. De exemplu, s-ar putea găsi următoarele date :

Clasa 1	Clasa a II-a	Clasa a III-a
P.	NP	T.
64	6	30

Întrucât clasele paterne și non-paternale nu apar în proporții egale, putem concluziona că nu există



www.medilibros.com

FIGURA S.21 Distintos tipos de intercambio que dan lugar a los genotipos que se encuentran en las tétradas de *Chlamydomonas* cuando se consideran dos genes localizados en el mismo cromosoma.

o sortare independentă și că cele două gene sunt legate . Putem apoi continua cu determinarea distanței pe hartă dintre ele.

În analiza acestor date, suntem interesați să determinăm ce tipuri de tetrade reprezintă schimburi genetice în intervalul dintre cele două gene. Tetradele de ditip paternal (P) apar numai atunci când nu există o încrucișare între cele două gene. Tetradele de ditip non-paternal (NP) apar numai atunci când există un schimb dublu între cele două gene, implicând toate cele patru cromatide. Tetradele tetratip (T) apar atunci când există o singură încrucișare sau când are loc un tip alternativ de schimb dublu între cele două gene. Diferitele tipuri de schimb descrise aici sunt prezentate în Figura 5.21.

acestor tipuri de tetrade a fost determinată , este posibil să se calculeze distanța pe hartă dintre cele două gene legate. Următoarea formulă ne permite să calculăm frecvența de interschimbare (ca procent), care este proporțională cu distanța pe hartă dintre cele două gene:

frecvență _ NP + 1/2(T) * 100

schimb (%) număr total de tetrade

În această formulă, NP reprezintă tetrade non-paternale ; toate produsele meiotice prezintă un singur schimb. Tetradele tetratip sunt reprezentate de T; presupunând doar schimburi individuale, jumătate din produsele meiotice prezintă schimburi. Suma tetradelor numărate care aparțin acestor categorii este apoi împărțită la numărul total de tetrade examinate (P + NP + T). Dacă acest număr este înmulțit cu 100, va fi convertit într-un procent, care este direct echivalent cu distanța de pe hartă dintre gene.

În exemplul nostru, calculul arată că genele *a* și *b* sunt separate de 21 um.

$$6 \pm M \times 100 - É \pm 15 \times 100,2L \times 100 = 21\%$$

100 100100

Deși am luat în considerare analiza linkage-ului și cartografierea doar a două gene simultan , astfel de studii implică adesea trei sau mai multe gene. În aceste cazuri, se poate determina atât secvența, cât și distanța pe hartă a genelor.

5.11

A găsit Mendel legătura?

Încheiem acest capitol examinând o interpretare modernă a experimentelor care au servit drept piatră de temelie a transmiterii genetice: încrucișările Mendel cu mazăre.

Unii cercetători cred că Mendel a avut mare noroc în experimentele sale clasice cu mazăre de grădină. Conform interpretării acestor cercetători, Mendel nu a găsit nicio relație de legătură între cele șapte trăsături mutante din încrucișările sale. Dacă Mendel ar fi obținut date extrem de variabile, caracteristice pentru legătură și încrucișare, este posibil să nu fi avut succes, susțin acești cercetători , în recunoașterea și interpretarea corectă a tiparelor de bază ale moștenirii .

Articolul lui Stig Blixt, retipărit integral în caseta de mai jos, demonstrează insuficiența acestei ipoteze. După cum vom vedea, unele dintre genele lui Mendel erau într-adevăr legate între ele. Să-l lăsăm pe Stig Blixt să explice de ce Mendel nu a detectat legătura.

De ce nu a găsit Gregor Mendel legătura?

S. Se spune adesea că Mendel a fost foarte norocos să nu fi întâmpinat complicațiile linkage-ului în experimentele sale. El a folosit șapte gene, iar planta de mazăre are doar șapte cromozomi. S-a sugerat că, dacă ar fi analizat doar încă unul, ar fi întâmpinat probleme. Totuși, aceasta este o simplificare crasă. Situația reală era, cel mai probabil, că Mendel a lucrat cu trei gene situate pe cromozomul 4, două gene pe cromozomul 1 și câte o genă pe cromozomii 5 și 7 *(vezi* Tabelul 1). La prima vedere, se pare că, dintre cele 21 de combinații dihibride posibile pe care Mendel le-ar fi putut studia teoretic , cel puțin patru (adică *ai, v-fa, v-le* și *fa-le)* ar fi trebuit să dea rezultate de linkage. Cu toate acestea, așa cum s-a constatat în sute de încrucișări și conform - hărții genetice a plantei de mazăre, *a* și *i* de pe cromozomul 1 sunt situate atât de departe încât linkage-ul nu este detectat în mod normal . Același lucru este valabil și pentru *v.* și *le* pe o parte, iar fa pe cealaltă, de la cromozomul 4. Aceasta lasă *v-le, care ar fi* trebuit să prezinte linkage.

Totuși, se pare că Mendel nu a publicat această combinație specifică și, prin urmare,

Probabil că acest lucru a însemnat că încrucișarea corespunzătoare pentru a realiza segregarea simultană a ambelor gene nu a fost niciodată efectuată. Prin urmare, nu este atât de surprinzător faptul că Mendel nu a abordat complicația linkage-ului, deși nu a evitat-o alegând câte o genă din fiecare cromozom.

Stig Blixt

Institutul de Ameliorare a Plantelor Weibullsholm, Landskrona, Suedia, și Centro de Enerva Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, Brazilia.

Sursa: **Retipărit cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: Nature, „De ce nu a găsit Gregor Mendel legătura?" de Stig Blixt.** *Nature,* **vol. 256. Drepturi de autor 1975. www.nature.com**

TABELUL 1 Relațiile dintre terminologia genetică actuală și perechile de trăsături utilizate de Mendel

Pereche de caractere folosite de Mendel,	Alele în terminologie actuală pe cromozom	localizat
Culoarea semințelor, galben-verzui	*Ii*	1
Coajă de semințe și flori, colorate în alb	*A-aV-v*	1
Păstăi mature, umflate, cu riduri netede	*Fa-fa*	4
Inflorescențe, pe axa frunzelor umbelate din vârful plantei. Înălțimea plantei, 0,5-1 m.	*Le-*	4
Păstăi necoapte, galben-verzui	*leGp-*	4
Semințe mature, netede-aspre	*gpR-r*	5 7

EXPLORARE DE GENOMICĂ

Hărți ale cromozomilor umani pe internet

MG *Domeniu de studiu: Explorare genomică*

ȘI În acest capitol, am explicat modul în care datele de recombinare pot fi analizate pentru a dezvolta hărți cromozomiale bazate pe linkage. Deși analiza linkage și cartografierea cromozomială rămân tehnici importante în domeniul geneticii, hărțile cromozomiale sunt dezvoltate din ce în ce mai mult pentru multe specii , utilizând tehnici genomice pentru secvențierea cromozomilor întregi . Ca urmare a Proiectului Genomului Uman, hărțile cromozomiale umane sunt acum disponibile gratuit pe internet. Cu un singur clic de mouse , puteți obține acces imediat la o cantitate incredibilă de informații. În acest exercițiu, vom explora site -ul web Genes and Disease

al Centrului Național pentru Informații Biotehnologice (NCBI) pentru a afla mai multe despre hărțile cromozomiale umane .

■ Site-ul NCBI Genes and Disease

Site-ul NCBI este o resursă extrem de valoroasă pentru date genomice . Aici vom explora site-ul Genes and Disease, care prezintă hărți ale cromozomilor umani care arată locația anumitor gene asociate cu anumite boli.

1. Accesați site-ul web Genes and *Disease* la adresa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22183/
2. În secțiunea care descrie conținutul site-ului, faceți clic pe *„ hărți cromozomiale" pentru* a vizualiza o pagină cu o imagine a unui cariotip cromozomial uman. Faceți clic pe un cromozom din imaginea hărții cromozomiale , derulați în jos pe pagină pentru a vizualiza un cromozom sau faceți clic pe unul dintre cromozomii listați în partea dreaptă a paginii. De exemplu, faceți clic pe cromozomul 7. Rețineți că deasupra imaginii cromozomului sunt afișate numărul de gene de pe cromozom și numărul de - perechi de baze pe care le conține cromozomul .
3. Priviți din nou cromozomul 7. La prima vedere , ați putea crede că există doar cinci gene asociate bolilor pe acest cromozom, deoarece lista inițială arată doar o selecție de gene asociate cu bolile.

Totuși, dacă faceți clic pe linkul *„MapViewer”* pentru cromozom (chiar deasupra desenului), veți vedea informații detaliate despre cromozom, inclusiv o „hartă principală” completă a genelor pe care le conține, care include simbolurile folosite pentru denumirea genelor:

Simbol: afișează simbolul corespunzător genei. *Linkuri:* elementele din coloana „Linkuri*” oferă acces la datele OMIM *(Online Mendelian Inheritance in Man)* (discutate în secțiunea „Explorarea genomicii ” din Capitolul 3) pentru o anumită genă , precum și informații despre proteine *(pr)* și liste de gene omoloage *(hnr,* care sunt alte gene cu secvențe similare).

4. Faceți clic pe linkul *Informații* pentru a afla - mai multe despre o genă .
5. Examinați hărțile cromozomiale în MapViewer până când vedeți oricare dintre genele marcate ca ***genă sau proteină ipotetică*** . (genă sau proteină ipotetică).
   a. Ce înseamnă a desemna o genă sau o proteină drept ipotetică?
   b. că folosesc analiștii genomici pentru a atribui un locus genetic unei gene care codifică o proteină ipotetică?

Vizitați pagina principală a NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview) pentru a accesa o bază de date excelentă care conține hărți cromozomiale pentru o gamă largă de organisme diferite . Explorați baza de date pentru a afla mai multe despre hărțile cromozomiale ale oricărui organism care vă interesează.

7. STUDIU DE CAZ | Relația cu autismul

Pentru părinții unui copil autist, înscrierea într -un program de cercetare părea o modalitate nu doar de a se educa despre afecțiunea copilului lor , ci și de a ajuta la cercetarea acestei tulburări comportamentale complexe . Cercetătorii le - au spus cuplului că există o influență genetică puternică asupra autismului, deoarece rata de concordanță la gemenii identici este de aproximativ 75%, în timp ce scade la doar 5% la gemenii fraterni . În plus, cercetătorii au identificat interacțiuni între cel puțin zece gene candidate distribuite pe cromozomii 3, 7, 15 și 17. Lipsindu-le o înțelegere generală a principiilor genetice de bază, cuplul a ridicat o serie de întrebări interesante. Cum ar răspunde la ele?

1. Ce este o genă „candidată”?
2. Având în vedere că trebuie să existe mai multe gene candidate pe același cromozom, vor fi acestea transmise întotdeauna ca un bloc de informații genetice dăunătoare viitorilor urmași?
3. Având în vedere o afecțiune genetică aparent complexă, care este probabilitatea ca următorul nostru copil să fie și el autist?
4. Va fi posibil diagnosticul prenatal în sarcinile viitoare ?

Puncte de rezumat

1. Genele situate pe același cromozom se numesc legate. Prin urmare, alelele situate pe același omolog pot fi transmise împreună în timpul formării gameților.
2. Frecvența încrucișării între genele legate în timpul formării gameților este proporțională cu distanța dintre gene , oferind baza experimentală pentru cartografierea locației genelor una față de cealaltă de-a lungul cromozomului .
3. Determinarea secvenței genice într- un experiment de cartografiere în trei puncte necesită analizarea gameților cu încrucișare dublă, așa cum se reflectă în fenotipul urmașilor care primesc acești gameți.
4. Interferența este un fenomen care descrie gradul în care crossing-ul într- o regiune a unui cromozom influențează crossing-ul într- o regiune adiacentă a cromozomului și se cuantifică prin calcularea coeficientului de incidență (C).

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare , vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

5. Studiile de linkage uman, care au fost efectuate inițial folosind analize genealogice și de scorare LOD și ulterior folosind tehnici de hibridizare a celulelor somatice, au fost acum îmbunătățite prin utilizarea markerilor moleculari ADN nou descoperiți .
6. Analiza linkage-ului și cartografierea cromozomilor pot fi efectuate la eucariotele haploide prin analiza directă a produselor meiozei , cum ar fi ascosporii din *Neurospora.* Aceste studii oferă, de asemenea, baza pentru a distinge între linkage și asortiment independent.
7. Investigații citologice, atât la porumb, cât și la *Drosophia ,* au arătat că încrucișarea implică un schimb fizic de segmente între cromatide non-surori.
8. Se știe că în timpul mitozei au loc evenimente de recombinare între cromatidele surori, iar aceste evenimente se numesc schimburi de cromatide surori (SCH).

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Într -o serie de încrucișări pentru o hartă în două puncte, care implică trei gene legate pe cromozomul III al *Drosophilei,* au fost calculate următoarele distanțe:

CD-SR CD-RO de 13 um
16 um

(a) De ce nu putem determina secvența și construi o secvență a acestor trei gene?
(b) Ce date cartografice ar permite rezolvarea acestei probleme?
(c) Putem spune care dintre secvențele prezentate aici este corectă?

ro—^—cd—^—sr

fie

sr-^cd-^-ro

Soluţie

(a) Este imposibil să se facă acest lucru deoarece există două posibilități bazate pe aceste date limitate.

Cazul 1: *cd~^—sr—*—ro*

fie

Cazul 2: ***ro— cd—** sr*

(b) Distanța de pe hartă determinată de intersecția dintre ro și *sr.* Dacă cazul 1 este corect, ar trebui să fie 3 um, iar dacă cazul 2 este corect , 29 um . De fapt, această distanță este de 29 um, demonstrând că și cazul 2 este corect .
(c) Nu; pe baza datelor de pe hartă, acestea sunt echivalente.

2. În *Drosophila,* Mutațiile Lyra (*Ly)* și *Stubble (Sb)* sunt dominante și sunt localizate la locurile 40 și respectiv 58 ale cromozomului III. A fost descoperită o mutație recesivă cu ochi roșii aprinși , localizată tot pe cromozomul III. O hartă a fost obținută prin încrucișarea unei femele heterozigote pentru toate cele trei mutații cu un mascul homozigot pentru mutația ochi roșii aprinși (pe care o vom denumi aici *br).* Datele obținute sunt prezentate în tabel. Determinați locația mutației br . cromozomul 3. Folosind Figura 5.13, preziceți ce mutație ar fi fost descoperită . Cum puteți fi sigur?

Soluție. Mai întâi, determinați distribuția alelelor în omologii părinților

Fenotipo			Número
(00	5b	*br*	404
(2) +	+	T	422
(3) O'		+	18
(4) +	5b	**br**	16
(5)0	+	*br*	75
(6) +	5b	+	59
(7)0	5b	+	4
(8) +	-1-	*br*	2
Total			= 1.000

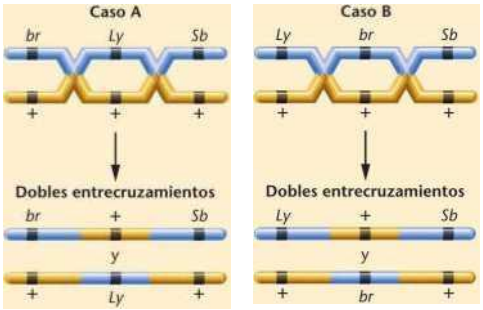
recombinanti heterozigoți (femela în acest caz). Pentru a face acest lucru, localizați cele mai frecvente fenotipuri reciproce, care corespund gameților nerecombinanti. Acestea sunt fenotipurile 1 și 2. Fiecare fenotip reprezintă poziția alelelor în fiecare dintre omologi. Prin urmare , distribuția alelelor este:

Ly Sb br

În al doilea rând, determinați *secvența* Secvența corectă a celor trei loci de-a lungul cromozomului este determinată prin identificarea secvenței care produce fenotipurile dublu recombinante observate, care sunt fenotipurile reciproce mai puțin frecvente (7 și 8). Dacă secvența este corectă așa cum este scrisă, atunci va avea loc o încrucișare dublă, cum ar fi cea prezentată aici.

Ly Sb br

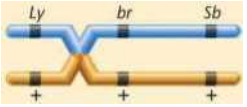
ar da *Ly + br* y + *Sb* + ca fenotipuri. La inspecție, se verifică faptul că aceste clase (5 și 6) sunt de fapt încrucișări simple , nu încrucișări duble. Prin urmare, secvența, așa cum este scrisă, este incorectă. Există doar alte două secvențe posibile . Fie gena *Ly* (cazul A de mai jos) sau gena *br* (cazul B de mai jos) sunt situate între celelalte două gene.



Comparația cu datele reale arată că cazul B este corect. Gameții 7 și 8 , dublu recombinați , produc muște care exprimă *Ly* și *Sb.* dar nu , *frate.* sau care exprimă br, dar nu *LySb.* Astfel, *aranjamentul* iar secvența *corectă* este următoarea :

Ly *br* *Sb*

Odată ce secvența este găsită, este posibil să se determine locația lui hr în raport cu Ly *și Sb.* O simplă recombinare între *Ly și br,* așa cum se arată aici



Aceasta dă naștere la muște care sunt *Ly* + + și + &r Sfr (fenotipurile 3 și 4). Prin urmare, distanța dintre lotul *Ly* și brea este egală

18+ 16 + 4 + 2 **40**
' LQOti 1.000 **= 0,04 = 4 uni**

Rețineți că, deoarece trebuie să cunoaștem frecvența tuturor recombinărilor dintre *Ly* și *br* , trebuie să adăugăm recombinările dublu recombinante, deoarece acestea reprezintă două recombinări simple care apar simultan. În mod similar, distanța dintre loci br și Sfr derivă în principal din recombinările simple dintre ele.

Acest lucru are ca rezultat fenotipuri *Ly* br 4- și + 4- 5b (clasele 5 și

6). Prin urmare, distanța este egală cu

Harta completă arată că br este situat la locusul 44, deoarece *Lyra* și Síubbfe sunt cunoscute.

75 + 59 + 4 + 2
i.DOO **1000** **= 0,14 = 14 um**

40 -------- (4) -------- 44- (14)58

£y *br* *Sb*

O inspecție a Figurii 5.13 arată că *mutația stacojie,* care dă naștere ochilor strălucitori „roar", se află la locusul 44, așadar este rezonabil să presupunem că mutația ochiului strălucitor „roar" este o alelă a genei *setifici.* Pentru a testa această ipoteză, am încrucișa femele ale mutantului nostru cu cărămizi roșii cu *masculi stacojii.* Dacă ambele mutații sunt alele, nu va exista complementare, iar toți urmașii vor avea ochi roșii aprins . Dacă există complementare , toți urmașii vor avea ochi roșii-cărămizii normali (tipul sălbatic), deoarece mutațiile pentru ochi roșii aprins și *stacojii* vor fi la loci diferiți (probabil foarte apropiați). În acest caz, toți urmașii vor fi heterozigoți pentru ambele loci și nu vor exprima niciuna dintre mutații, deoarece ambele sunt recesive . Această încrucișare reprezintă ceea ce se numește un *test aldism.*

3. La iepuri, culoarea neagră (B) este dominantă față de maro (b), în timp ce culoarea plină (C) este dominantă față de chinchilla (c). Genele care controlează aceste trăsături sunt legate. Iepurii care au fost heterozigoți pentru ambele trăsături și **au exprimat negru și culoare plină au fost** încrucișați cu **iepuri maro și chinchilla, cu** următoarele **rezultate;**

31 maro, chinchilla
34 negru, color
16 maro, color complet
19 negru, chinchilla

Determinați aranjamentul alelelor la părinții heterozigoți și distanța pe hartă dintre cele două gene.

Soluție: Aceasta este o problemă de hartă cu două puncte. Cele două fenotipuri reciproce cele mai răspândite sunt nerecombinante, iar fenotipurile reciproce mai puțin frecvente apar din cauza încrucișării simple. Distribuția alelelor este dedusă din fenotipurile nerecombinante, deoarece acestea primesc gameți intacți.
Încrucișările simple au ca rezultat 35/100 de urmași (35 %). Prin urmare, distanța dintre cele două gene este de 35 µm.

8 C *b* *{.ch*

X

b *b*

T
No recombinantes

B *C* *b*

b *c[ch] brown, chinchilla*

Recombinanți simpli

B c ch *b* **c**

6 *c [i:h]* *b* c th
negru, maro chinchilla *, plin*

4, Într-o încrucișare la *Neurospora* , unde un părinte a exprimat alela - mutantă *a,* iar celălalt fenotipul sălbatic (4-), s-au obținut următoarele date în analiza ascosporilor;

	Băieți de Ü					
	1	2	3	4	5	6
	4	*la*	*aa*	+	**d**	+
Yo	+	*la*		+	*cui*	
D O-	+	*cui*	4-	*cui*	4-	*cui*
M & HB	+	*cui*	4	*cui*	+	*cui*
	cui	4-	cui	+	+	*Ú*
» .. -oc .2	*cui*	4-	*cui*	4-	+	*cui*
·v C	*la*	4-	+	*la*	*deoarece*	j-
pentr „Ï v>"	*la*	+	+	*la*	*la*	+
	39	33 de ani	5	4	9	10 Total = 100

Calculați distanțele dintre genă și centromer.

Soluție. Tipurile 1 și 2 reprezintă segreganți în prima diviziune (spd) unde nu a avut loc încrucișarea între locusul *a* și centromer. Celelalte (3-6) reprezintă segregarea în a doua diviziune (ssd). Aplicând formula, obținem următorul rezultat:

$$d = 1/2(5 + 4 + 9 + 10)/100 =$$

$$\text{distanță} = \frac{1/2}{\text{cenușă totală}}$$

SSD

1/2(28)/100

= 0,14

= 14 µm

Problemas y preguntas para la discusión

DE CUM ȘTIM?

1. În acest capitol, ne-am concentrat pe linkage, cartografierea cromozomilor și multe fenomene asociate. De-a lungul procesului, am întâlnit numeroase ocazii de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?

   (a) Cum s-a stabilit experimental că frecvența de recombinare (crossing over) dintre două gene este legată de distanța dintre ele în cadrul cromozomului?
   (b) De unde știm că anumite gene specifice sunt legate pe același cromozom, în loc să fie situate pe cromozomi diferiți?
   (c) De unde știm că încrucișarea este rezultatul unui schimb fizic între cromatide?
   (d) De unde știm că cromatidele surori se recombină în timpul mitozei?
   (e) Când nu se pot face împerecheri selective într-un organism (de exemplu, la oameni), cum știm că genele sunt legate și cum le putem cartografia?

2. Care este importanța încrucișării (care duce la recombinare genetică) în procesul evolutiv?
3. Descrieți observația citologică care sugerează că crossing- over-ul are loc în prima profază a meiozei .
4. De ce apar mai multe încrucișări între două gene legate la distanță decât între două gene care sunt apropiate una de cealaltă pe cromozom?
5. Explicați de ce 50 % este limita superioară pentru recuperarea produselor din recombinări individuale , chiar dacă încrucișarea între două gene legate are loc *întotdeauna* .
6. De ce se așteaptă ca recombinarea dublă să fie mai puțin frecventă decât recombinarea simplă ?
7. Care sunt bazele interferenței pozitive ?
8. Care sunt două criterii esențiale care trebuie îndeplinite pentru a efectua cu succes o secțiune transversală în vederea obținerii unei hărți?
9. Genele *dumpy (dp), dot (d)* și *apterous (ap)* sunt legate pe cromozomul II al *speciei Drosophila*. Într-o serie de încrucișări pentru cartografiere

   Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masleringgenetics.com

   Din două puncte, au fost determinate următoarele distanțe genetice . Care este secvența acestor trei gene?

   dp-ap 42

   dp-d 3

   ap-d 39

10. La porumb, aleurona colorată (din boabe) se datorează alelei dominante *R*. Alela recesivă *r* Produce, în homozigozitate, o alelă incoloră . Culoarea plantei (nu a boabelor) este controlată de o altă genă cu două alele, *Y și y*. Alela *Y* dominantă are ca rezultat culoarea verde , în timp ce prezența homozigotă a alelei *y* recesive are ca rezultat culoarea verde. Aceasta are ca rezultat planta îngălbenită. Într-o încrucișare de testare între o plantă cu genotip și fenotip necunoscute și o plantă homozigotă recesivă pentru ambele trăsături , s-au obținut următorii urmași:

Verde	colorat 88 Verde incolor 8		
Galben colorat	12 Galben incolor		92

   Explicați cum au fost obținute aceste rezultate, determinând genotipul și fenotipul exact al plantei necunoscute, inclusiv aranjamentul precis al alelelor pe omologi.

11. În încrucișarea prezentată aici, care implică două gene legate, *ebony (e)* și *claret (ca)* de Drosophila, unde nu există încrucișare la masculi , *s* - au obținut urmași în raportul fenotipic 2+ : 1 en : 1 e:

9			*
e *ca* +	X.		*e* *ca**
e + *ca*			*e**ca*

   Aceste gene sunt situate la o distanță de 30 µm pe cromozomul III . Care este contribuția crossing-over - ului la femele la producerea acestor fenotipuri?

12. Într-o serie de încrucișări pentru hărți cu două puncte referitoare la cinci gene situate pe cromozomul II al *Drosophilei,* s-au observat următoarele frecvențe recombinante (încrucișări simple) :

pr-adp	*29%*
*pr-^*	13%
pr-c	21%
pr-b	6%
adp-b	35%
adp-c	8%
adp-vg	16%
vg-b	19%
vg-c	8%
cb	27%

(a) Dacă gena adp este situată aproape de capătul cromozomului - ma11 (locus 83), construiți o hartă pentru aceste gene .

(b) Într-o altă serie de experimente, o a șasea genă, d , a fost testată în raport *cu pr.*

db	*17%*
d-pr	*23%*

Preziceți rezultatele hărților cu două puncte între *d* și *c, d* și vg *și dy adp.*

13. Două femele diferite de Drosophila au fost izolate . ambele heterozigote pentru genele autozomale *b (corp negru), d (tarsos de dacha) și v (aripi curbate)*. Aceste gene se găsesc în ordinea dbc , fiind *b* mai aproape de *d* decât de *c.* Este prezentată locația genelor la fiecare femelă , împreună cu diferiții gameți produși de ambele:

Hembra A		Hembra B	
db **+**		***d*** **+ +**	
+ + *c*		**+ *bc***	
Formarea gameților		1	
(1)db **c**	(S)d + +	(1)rf *b* +	(5) </ *bc*
(2) + + +	(6) + *fi*	(2) + + c	(6)4- 4- +
(3) + + c	*(7)â* **+ *c***	(3)d **+ *c***	*(7)dbc*
(4)db +	(8) + *b* +	(4) + *b* _+	(8) 4- *i.Hr.*

Identificați care clase sunt nerecombinante (NR), monorecombinante (RS) și dublu recombinante (DR) în fiecare caz. Indicați frecvența relativă la care va apărea fiecare .

14. La **Drosophila**, s-a realizat o încrucișare între femele care exprimă cele trei trăsături recesive legate de cromozomul X , **scute* quercus ** (se), **saber* body *** (s) și **vermilion eyes ** (v),* cu masculi de tip sălbatic . În generația F1, toate femelele au fost de tip sălbatic, în timp ce toți masculii au exprimat cele trei trăsături mutante. Încrucișările au fost efectuate până la generația F2 . și au fost numărați 1.000 de descendenți , rezultatele fiind prezentate mai jos :

Fenotip	Descendenți
SC SV	314
+++	280
+ ***SV***	150
SC ++	156
SC + V	46
+ S +	30
SC S +	10
+ ***+ V***	14

Sexul puilor nu a fost determinat .

(a) Folosind nomenclatura corespunzătoare, determinați genotipurile părinților P și F.

(b) Determinați secvența celor trei gene și distanțele lor pe hartă.

(c) Există mai multe sau mai puține încrucișări duble decât era de așteptat ?

(d) Calculați coeficientul de coincidență . Există interferență pozitivă sau negativă?

15. O altă încrucișare la *Drosophila* a implicat genele recesive legate de X *yellow (y), white (w) și cut (ct). O femelă cu ochi albi,* corp galben și aripi normale a fost încrucișată cu un mascul cu corp și ochi normali, dar cu aripi tăiate. Femelele F2 au fost de tip sălbatic pentru toate cele trei trăsături, în timp ce masculii F2 aveau corp galben și ochi albi. S - a realizat o încrucișare pentru a obține generația F2 , unde au fost luați în considerare doar masculii . Pe baza datelor prezentate aici, construiți o hartă genetică:

Fenotip	Descendenți masculi
/ + ct	9
+ EU +	6
yw ct	90
+++	95
+ + ct	424
yw +	376
și + +	0
+ w ct	0

(a) Desenați o diagramă a genotipurilor parentale F1 .

(b) Presupunând că *albul* se află la locusul cl 1,5 al cromozomului X, construiți harta .

(c) De ce nu s- au găsit urmași dublu recombinanți ?

(d) Ar putea fi folosite femelele urmașe F2 pentru a construi harta ? De ce sau de ce nu ?

16. La *Drosophila,* mutația *Dichaete* (D) este situată pe cromozomul III și are un efect dominant asupra formei aripii . Este letală la homozigoți. Genele *ebony (e) și pink (p) sunt* mutații recesive pe cromozomul III. Mușteles dintr -o tulpină *Dichaete* au fost încrucișate cu muște *ebony* și pink homozigote , *iar* urmașii F1t cu fenotipul Dichaete au fost retroîncrucișați cu muște *ebony și pink homozigote.* Folosind rezultatele acestei retroîncrucișări prezentate în tabel :

(a) Desenați o diagramă a acestei încrucișări, arătând genotipurile părinților și urmașilor ambelor încrucișări .

(b) Care este secvența și distanța dintre aceste trei gene?

Fenotip	Număr
Dichaete	401
abanos, roz	389
Dichaete, abanos	84
roz	96
Dichaete, roz	2
abanos	3
Dichaete, abanos, roz	12
sălbatic	13

17. Femelă *de Drosophila,* homozigotă pentru genele *roz* și *abanos* de pe al treilea cromozom (aceleași gene ca și

Problema 16) cu masculi homozigoți pentru gena *dumpy* de pe al doilea cromozom. Deoarece aceste gene sunt recesive, toți urmașii au fost de tip sălbatic (normali). O încrucișare de testare a fost efectuată între femele p! și masculi triplu recesivi . Presupunând că cele două gene legate, *pink* și *ebony,* sunt situate la o distanță de 20 µm, preziceți rezultatele acestei încrucișări. Dacă s-ar fi efectuat încrucișarea reciprocă (masculi Fj - unde nu există încrucișare - cu femele triplu recesive), cum s-ar schimba rezultatele , dacă s-ar schimba deloc?

18. La *Drosophila,* două mutații, *Stubble (Sb)* și *curled (cu),* sunt legate pe cromozomul 111. *Stubble* este o genă dominantă , letală în homozigoție, iar *curled* este recesivă. Dacă o femelă de genotip

$$\frac{Sb\ cu}{+\quad +\blacksquare}$$

Dacă un mascul este încrucișat pentru a detecta recombinante printre urmașii săi, ce genotip masculin ați alege pentru această încrucișare?

19. s-ar efectua încrucișarea descrisă în Problema 18 și dacă *Sb* și *cu* ar fi separate prin 8,2 unități de hartă pe cromozomul III și dacă s-ar obține 1.000 de urmași, care ar fi rezultatul încrucișării, presupunând că s-ar observa un număr egal de masculi și femele ?
20. Sunt recombinarea mitotică și schimbul de cromatide surori eficiente în producerea variabilității genetice la un individ? Și la urmașii indivizilor?
21. Ce concluzii se pot trage din faptul că crossing- over-ul nu are loc la masculul de Drosophila și că în timpul meiozei nu se observă complexe sinaptinemice la masculi, dar se *observă* la femele unde are loc crossing-over-ul ?
22. de testare a fost efectuată între un organism cu genotipul *AaBbCc* și triplu recesiv *(aabbcc).* Genotipurile urmașilor au fost cele detaliate în tabelul următor:

20 *AaBbCc*	20 *AaBbcc*
20 *aaBbCc*	20 *aabbcc*
5 *aabbCc*	20 *Aabbcc*
5 *aaBbCc*	5 *aaBbcc*

(a) Dacă aceste trei gene s-ar transmite independent, câte clase genotipice și fenotipice s-ar obține la urmași și în ce proporții, presupunând dominanță simplă și recesivitate în fiecare pereche de gene?

(b) Răspundeți la aceeași întrebare presupunând că cele trei gene sunt atât de strâns legate pe un cromozom încât gameții recombinanți nu se regăsesc în eșantionul de urmași .

(c) Ce puteți concluziona din datele reale despre amplasarea celor trei gene una față de cealaltă?

23. Pe baza discuției noastre despre inexactitatea așteptată a distanțelor de pe hartă (*vezi* (Figura 5.12), ați revizui răspunsul la Problema 22? Și dacă da, cum ?
24. Cartografierea genetică tradițională a fost aplicată cu succes la diverse organisme , inclusiv drojdie, ciuperci, porumb și Drosophila . Cu toate acestea, cartografierea genetică umană a căpătat o importanță similară abia în ultimii ani. Ce factori au contestat aplicarea tehnicilor tradiționale de cartografiere genetică la oameni?
25. Markerii ADN au îmbunătățit considerabil cartografierea genelor la oameni. Ce sunt markerii ADN și ce avantaje oferă ?
26. La o plantă, fructul este roșu sau galben, iar forma sa este ovală sau alungită, roșul și ovalul fiind trăsăturile dominante. O încrucișare de testare a fost efectuată cu două plante heterozigote pentru aceste - trăsături, cu următoarele rezultate:

Descendenți		
Fenotip	**Etajul A**	**Etajul B**
roșu, alungit	46	4
galben, oval	44	6
roșu, oval	5	43
galben, alungit	5	47
	100	100

Determinați locația relativă a genelor una față de cealaltă și genotipurile celor două plante- mamă .

27. Într -o încrucișare, s-au folosit două plante heterozigote pentru două perechi de gene *(Ab/aB),* ale căror loci sunt legați și separați de o distanță de 25 µm. Presupunând că există încrucișare în formarea gameților masculini și feminini și că alelele A și B sunt dominante, determinați raportul fenotipic al urmașilor.
28. Într-o încrucișare cu *Neurospora* cu două alele, *Prin b,se* S-a observat următorul model de tetrade . Calculați distanța dintre genă și centromer.

Modelul tetradic	Număr
BBbb	36
bbBB	44
BbBb	4
bBbB	6
BbbB	3
bBBb	7

29. În *Neurospora,* încrucișarea *a+ X + b* a produs doar două tipuri de tetrade ordonate, în număr aproximativ egal. Ce putem concluziona?

	Pereche de spori			
	1-2	3-4	5-6	7-8
Tetradă de tip 1	*un* +•	*un* 4-	4- *b*	4- *b*
Tetradă de tip 2	4- 4-	4-4-	*ab*	*ab*

30. Următoarele sunt două seturi de date derivate din două încrucișări la *Chlatnydomonas,* pentru trei gene cu alelele mutante *a, b și c.*

Genele	Trecere	P.	NP	T.
1	*a* și *b*	36	36	28 de ani
2	*byc*	79	3	18 ani
3	*ay c*	?	?	?

Determinați, pe cât posibil, aranjamentul acestor trei gene . Descrieți rezultatele așteptate ale încrucișării 3, presupunând că *a* și c sunt legate, separate de 38 um, și că au fost produse 100 de tetrade .

31. La *Chlamydomonas*, încrucișarea cl *ab* X 4-4- a produs următoarele tetrade dezordonate, unde *a și b* sunt legate:

(1)	+ 4 + 4- *abab*	38 de ani	(3)	*în* 4* *da* 4 4- *b* 4- *b*	6	(5)	*Da* 4-4 4- *b* *în* 4-	2
(2)	+ 4- *Da* 4-4- *ab*	5	(4)	*Da* *în* 4 + í> 4- 4-	17 ani	(«)	*Da* 4- *nu* 4- 4- 4-	3

(a) Identificați tetradele care reprezintă ditipuri paterne (P), ditipuri non-paterne (NP) și tetratipuri (T).
(b) Explicați originea tetradei (2) .
(c) Determinați distanța de pe hartă dintre *a și b.*

32. Următoarele rezultate sunt perechi de tetrade ordonate dintr-o încrucișare între o tulpină *cd și* o tulpină 4-+:

Clasa Tetradei						
1	2	3	4	5	6	7
C. 4- *C.* 4-	*C* + *CD*	*CD* *CD*	4- *d* *c* 4-	*c.* 4- 4- 4-	*CD* 4- 4-	*c.* 4- 4- *d*
4- *d*	4- 4-	4- 4-	*c.* 4-	*CD*	*CD*	*CD*
4- *d*	+ *d*	4- 4-	+ *d*	4- *d*	4- 4-	4- +
1	17 ani	41	1	5	3	1

Acestea sunt rezumate prin clase tetradice.
(a) Indicați tipul de igienă pentru fiecare clasă de la 1 la 7 (P, NP sau T) .
(b) Datele de mai sus susțin concluzia că loci c *și d* Acestea sunt legate. Indicați dovezile care susțin această concluzie .
(c) Calculați distanța genă -centromer pentru fiecare locus.
(d) Calculați distanța dintre cele două loci legate .
(e) Desenați harta cromozomului , inclusiv centromerul , și explicați discrepanța dintre distanțele determinate prin cele două metode diferite din secțiunile (c) și (d).
(f) Descrieți aranjamentul trecerilor de nivel necesare pentru a produce bazele de clasa 6.

33. La o trecere de pietoni din *Chlamydomonas, Alberta* X *ab,* 211 toalete dezordonate au fost recuperate:

10	*AB*	*Abdomen*	*aB*	*ab*
102	*Abdomen*	*aB*	*Abdomen*	*aB*
99	*AB*	*AB*	*ab*	*Abdomen*

n

(a) Asociați fiecare dintre cele trei tipuri de tetrade din problemă cu denumirea (denumirea) corespunzătoare.
(b) Sunt genele *A și B* legate?
(c) Dacă sunt legate, determinați distanța pe hartă dintre cele două gene. Dacă nu sunt legate, furnizați cât mai multe informații posibil pentru a explica de ce trageți această concluzie .

Probleme suplimentare picante

34. Au fost examinate o serie de clone hibride de celule somatice omșoarece pentru a verifica expresia unor gene umane specifice și prezența cromozomilor umani. Rezultatele sunt rezumate în tabelul următor. Atribuiți fiecare genă cromozomului pe care se află.

	Clonă de celule hibride				
	LA	B.	C.	D.	ȘI	F
Genele care se exprimă						
ENO1 (enolaza 1)	-	-	4-	4-	4-	-
MDH1 (malato deshidrogenasa 1)	4.	4-	-	4-	-	4-
PEPS (peptidază S)	4	-	4-	-	-	-
PGM1 (fosfo-glucornu tasa 1)	-	4-	-	4-	4-	-
Cromozomi (prezent 0 | lipsă)					
1		-	4-		4-	4-	-
2		4-	4-	—	4-	-	4-
3		1	4-	-	—	4-	-
4		4-	«	4-	-	■■	-
5		-	4-	4-	4-	4-	4-

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați wyvw.masteringgenetics.com

35. O femelă de genotip

ab

Meioza produce 100 de tetrade. Dintre acestea, 68 nu au fost recombinante . Dintre cele 32 rămase , 20 au fost recombinante între *a și b* .
b, 10 între *c* și 2 recombinante duble între *a și b* și între *b și*
c. Dintre cei 400 de gameți produși, câți vor exista din fiecare dintre cele opt genotipuri posibile? Presupunând că ordinea alelelor este abc , Care este distanța pe hartă dintre aceste locuri?

36. Într-un laborator, un student la genetică a fost însărcinat să studieze o mutație necunoscută a *speciei Drosophila* , care avea ochi albicioși . El a încrucișat femele din tulpina sa mutantă pură cu masculi de tip sălbatic (cu ochi roșu-cărămiziu), recuperând toate mușterele F2 de tip sălbatic . În generația F2 , a obținut următorii urmași, în următoarele proporții:

tip sălbatic	5/8
ochi roșii strălucitori	1/8
ochi căprui	1/8
ochi albi	1/8

Studentul a fost confuz până când instructorul a sugerat că, probabil, ochii albicioși ai tulpinii originale erau rezultatul

homodgoziei unei mutații pentru ochii căprui / unei mutații pentru ochii roșii aprinși, un caz de interacțiune genetică *(vezi* Capitolul 4). După îndelungi reflecții , elevul a reușit să analizeze datele, să explice rezultatele și să învețe mai multe lucruri despre locația relativă a celor două gene. O cheie pentru înțelegerea lor a fost faptul că crossing- over- ul are loc la femelele *de Drosophila* , dar nu și la masculi . Pe baza analizei lor, ce a învățat elevul despre cele două gene ?

37. *Drosophila melanogaster* are o pereche de cromozomi sexuali (XX sau XY) și trei perechi de autozomi, denumiți cromozomi II , III și IV. Un student la genetică a descoperit un mascul de muscă cu picioare foarte scurte *(sh).* Folosind acest mascul, studentul a reușit să stabilească o tulpină pură a acestui mutant, confirmând că acesta era recesiv. Studentul a încorporat apoi mutantul într-o tulpină pură care conține genele recesive *negru (b,* culoarea corpului închis , situată pe cromozomul II) și *roz (p,* culoarea ochilor roz , situată pe cromozomul III). O femelă din tulpina homozigotă cu corp negru, ochi roz și picioare scurte a fost încrucișată cu un mascul de tip sălbatic . Masculii $_{F1}$ din această încrucișare au fost toți de tip sălbatic și au fost retroîncrucișați cu femele homozigote *b, p și sh* . Tabelul următor reflectă rezultatele generației F2 . NU S - au observat $_{alte}$ fenotipuri.

	Sălbatic	Roz*	Corp închis la culoare, picioare scurte*	Corp închis la culoare, rozaliu, picioare scurte
Femele	63	58	55 de ani	69
Bărbați	59	65	51	60

Celălalt personaj, sau celelalte două, sunt de tip sălbatic.

(a) Pe baza acestor rezultate, elevul a putut atribui gena pentru picioare scurte unui grup de legătură (unui cromozom). Care dintre ele era acesta? Explicați-vă raționamentul pas cu pas.

(b) Studentul a repetat experimentul efectuând încrucișări reciproce ale femelelor F1 retroîncrucișate cu masculi homozigoți *b, p, sh.* El a observat că 85% dintre urmași aparțineau claselor anterioare , dar că 15 % erau împărțiți în mod egal între masculii și femelele cu fenotipurile *b + p, b + +, + sh (p)* și + sh . +. Cum pot fi explicate aceste rezultate și ce informații pot fi deduse din ele?

38. La *Drosophila,* o femelă este heterozigotă pentru trei mutații : ochi *bar* (B), aripi *miniaturale* (m) și corp *de culoarea neagră* (e). Rețineți că *Bar* este o mutație dominantă. Musca este încrucișată cu un mascul cu ochi normali , aripi miniaturale și corp de culoarea neagră. Rezultatele încrucișării sunt următoarele:

111 miniatură	101 Bar, abanos
29 de tipuri sălbatice	31 Bar, miniatură, abanos
111 Bar	35 abanos
111 Bar, miniatură	115 miniatură, abanos

Interpretați rezultatele acestei încrucișări. Dacă ajungeți la concluzia că există o legătură între oricare dintre gene, determinați distanțele dintre ele pe hartă.

39. Gena care controlează alelele grupei sanguine Xg *(Xg* ' și Xg-) și gena care controlează o formă recesivă moștenită de slăbiciune musculară descrisă recent, numită slăbiciune musculară episodică *(EMWX)* (Ryan și colab., 1999), sunt strâns legate pe cromozomul X uman la poziția Xp22.3 (vârful brațului scurt). Un bărbat cu EMWX *care* este *Xg* El se căsătorește cu o femeie care este *Xg'* și au opt fiice și un fiu, toți fiind normali în ceea ce privește funcția musculară, bărbatul fiind Xg $^{+}$ și toate fiicele fiind heterozigote la ambii loci *EMWX.* și Xg. Mai jos este inclus un tabel care prezintă trei dintre fiice cu fenotipurile soților și fiilor lor .

(a) Creați o genealogie care să reprezinte toate datele indicate mai sus, precum și pe cele din tabelul următor.

(b) Pentru fiecare dintre urmași , indicați dacă a fost necesară sau nu o încrucișare pentru a produce fenotipurile indicate .

	Fenotipul soțului	Sexul copilului	Fenotipul urmașilor
Fiica 1	xg*	femeie bărbat	Xg $^{+}$ EMWX, Xg'
Fiica 2	Xg	bărbat femeie bărbat	Xg Xg* EMWX, Xg
Fiica 3	Xg	bărbat bărbat bărbat bărbat bărbat bărbat femeie femeie femeie	EMWX, Xg Xg $^{+}$ Xg EMWX, Xg* Xg EMWX, Xg Xg $^{+}$ Xg Xg $^{+}$

■ 10 Din cauza frecvenței relativ ridicate a erorilor meiotice care duc la anomalii de dezvoltare la om , multe eforturi de cercetare s-au concentrat pe identificarea corelațiilor dintre această frecvență a erorilor și comportamentul și morfologia cromozomilor . Tease și colab. (2002) au studiat ovocitele fetale umane ale cromozomilor 21, 18 și 13 folosind o tehnică imunocitologică ce permite estimarea directă a frecvenței și poziției recombinării meiotice. Un rezumat al informațiilor (modificat după Tease și colab., 2002) care compară frecvența recombinării cu frecvența trisomiei pentru cromozomii 21, 18 și 13 este furnizat mai jos . (Notă : Puteți citi secțiunile corespunzătoare *din* Capitolul 8 pentru o descriere a acestor afecțiuni de trisomie .)

Trisomie	Frecvența medie de recombinare	Frecvența nașterilor vii
Cromozomul 21	1.23	1/700
Cromozom 18 ani	2.36	1/3.000-1/8.000
Cromozomul 13	2,50	1/5.000-1/19.000

(a) Ce concluzii se pot trage din aceste date în ceea ce privește - frecvențele de non-disjuncție și recombinare? Cum ar putea influența frecvențele de recombinare frecvențele trisomiei ?

(b) Alte studii indică faptul că numărul de încrucișări per ovocit este oarecum constant și s-a sugerat că interferența cromozomială pozitivă acționează pentru a distribui un număr limitat de încrucișări între cât mai mulți cromozomi posibil. Având în vedere informațiile din partea (a), speculați-vă despre avantajul selectiv pe care l -ar putea conferi interferența cromozomială pozitivă.

Micrografía electrónica de transmisión de *E. coli* en conjugación.

6

Analiza și cartografierea genetică a bacteriilor și bacteriofagilor

CONCEPTE CAPITOL

►► Genomurile bacteriene au foarte adesea un singur cromozom circular. Bacteriile au dezvoltat numeroase modalități de a schimba și recombina informații genetice între celule individuale, inclusiv conjugarea , transformarea și transducția.

►> Capacitatea de a efectua conjugarea și de a transfera cromozomul bacterian dintr -o celulă în alta este guvernată de prezența informației genetice în ADN a unui factor de „ fertilitate" sau factor F. Factorul F poate exista autonom în citoplasma bacteriană sub formă de plasmidă sau se poate integra în cromozomul bacterian, unde facilitează transferul cromozomului de la celula donatoare la receptor, permițând recombinarea genetică.

►► Bacteriofagii sunt virusuri care utilizează bacterii ca gazde. ADN -ul viral este injectat în celula gazdă, unde se reproduce și dirijează reproducerea bacteriofagului și liza bacteriei .

►► În timpul infecției cu bacteriofag , replicarea ADN-ului fagic poate fi urmată de recombinare, care poate servi drept bază pentru cartografierea

intergenică și intragenică .

►► În cazuri rare, după infecție , ADN-ul bacteriofag se integrează în cromozomul gazdă , devenind profag și replicându-se de acolo împreună cu ADN-ul bacterian.

CAPÍTULO 6

lire sterline

În acest capitol, vom lăsa studiul geneticii cartografierii și transmiterii la eucariote pentru a analiza cartografierea genetică și recombinarea la bacterii și bacteriofagi, virusuri care utilizează bacteriile ca gazde. Atunci când ne vom concentra asupra acestor subiecte, va deveni clar că la bacterii și bacteriofagi au evoluat procese complexe care transferă informații genetice între celulele individuale care alcătuiesc o anumită populație. Aceste procese oferă geneticienilor baza pentru cartografierea cromozomilor.

Studiul bacteriilor și bacteriofagilor a fost esențial pentru avansarea cunoștințelor în multe domenii ale geneticii. De exemplu, o mare parte din ceea ce știm despre exprimarea și reglarea informațiilor genetice a fost descoperită inițial prin studii experimentale cu aceste organisme. În plus, așa cum vom vedea (Capitolul 20), cunoștințele noastre extinse despre bacterii și plasmidele lor rezidente au servit drept bază pentru utilizarea lor pe scară largă în clonarea ADN-ului și alte proceduri de ADN recombinant.

Valoarea bacteriilor și a virusurilor acestora ca organisme pentru cercetarea genetică se bazează pe două caracteristici importante. În primul rând, au cicluri reproductive extrem de scurte. Literalmente, se pot obține sute de generații într-o perioadă scurtă de timp, rezultând miliarde de bacterii sau fagi identici genetic. În al doilea rând, se pot studia culturi pure. Adică, o singură specie sau tulpină mutantă de bacterii sau un tip de virus poate fi ușor izolată și investigată independent de alte organisme similare. Drept urmare, acestea au fost indispensabile progresului realizat în domeniul geneticii în ultima jumătate de secol.

T1

Bacteriile se mută spontan și cresc exponențial

Studiile genetice efectuate asupra bacteriilor depind de capacitatea noastră de a studia mutațiile la aceste organisme. Se știe de mult timp că culturile bacteriene omogene genetic pot produce ocazional celule cu variații ereditare, în special legate de creșterea în anumite condiții de mediu. Înainte de 1943, cauza unor astfel de variații a fost intens dezbătută. Majoritatea bacteriologilor credeau că factorii de mediu induc modificări la anumite bacterii care le permit să supraviețuiască.

ANALIZĂ ȘI HĂRȚI **GENETICĂ LA BACTERII ȘI BACTERIOFAGI 1 SS** sau se adaptează la situații noi. De exemplu, se știa că tulpinile de *E. coli* erau susceptibile la infecția cu bacteriofagul TI. Infecția cu bacteriofagul TI duce la reproducerea virusului în detrimentul gazdei bacteriene, din care se eliberează noi fagi pe măsură ce celula gazdă este distrusă (liză). Dacă TI a fost însămânțat omogen pe o placă care conține *E. coli* , aproape toate celulele au fost infectate. Cu toate acestea, câteva celule *de E. coli* au supraviețuit infecției și nu s-au lizat . Dacă aceste celule au fost izolate și s-a stabilit o cultură pură , toți urmașii au fost rezistenți la infecția cu TI. Pentru a explica aceste observații, a fost propusă ipoteza adaptivă, care implică faptul că interacțiunea dintre fag și bacterie este esențială pentru dobândirea imunității . Cu alte cuvinte, expunerea la fag „induce" rezistență la bacterii.

Pe de altă parte, apariția mutațiilor spontane, care apar în prezența sau absența bacteriofagului TI , sugerează un model alternativ pentru a explica originea rezistenței la *E. coli.* În 1943, Salvador Luria și Max Delbrück au prezentat dovezi convingătoare că bacteriile, la fel ca organismele eucariote, sunt capabile de mutații spontane. Acest experiment, numit testul fluctuației , marchează începutul studiului modern al geneticii bacteriene. Vom explora această descoperire în Capitolul 16. Mutația spontană este considerată acum principala sursă de variație genetică la *bacterii* . Celulele mutante care apar spontan în culturi altfel pure pot fi izolate și stabilite independent de tulpina parentală folosind tehnici de selecție. Este vorba despre cultivarea organismului în condiții în care doar mutantul dorit prosperă, în timp ce tipul sălbatic nu . Cu o selecție atent concepută, mutațiile pentru aproape orice trăsătură dorită pot fi acum izolate . Deoarece bacteriile și virusurile conțin de obicei o singură copie a unui singur cromozom și, prin urmare, sunt haploide, toate mutațiile sunt exprimate direct în urmașii celulelor mutante, ceea ce face și mai ușoară studierea acestor microorganisme.

Bacteriile cresc într- un mediu de cultură lichid sau într -o placă Petri , pe o suprafață de agar semisolidă. Dacă componentele nutritive ale mediului de creștere sunt foarte simple și constau doar dintr -o sursă de carbon organic (cum ar fi glucoza sau lactoza) și o serie de ioni anorganici , cum ar fi Na^+ , K^+ , Mg^+ Prezența *, Ca'* și NH_4^+ ca săruri anorganice se numește mediu minimal. Pentru a crește într- un astfel de mediu, o bacterie trebuie să fie capabilă să sintetizeze toate componentele organice esențiale (de exemplu , aminoacizi , purine, pirimidine, zaharuri, vitamine și acizi grași). O bacterie care poate realiza această remarcabilă performanță biosintetică - ceva ce corpul uman

sintetiza unul sau mai mulți compuși organici, se numește prototrofă. Se spune că este de tip sălbatic pentru toate cerințele de creștere. Pe de altă parte, dacă o bacterie pierde, prin mutație, capacitatea de a sintetiza unul sau mai mulți compuși organici, se numește auxotrofă. De exemplu, o bacterie care pierde - capacitatea de a sintetiza histidină este desemnată *histidină auxotrofă,* spre deosebire de *histidină prototrofă* . *Pentru ca bacteria* histidină să crească , acest aminoacid trebuie adăugat ca - supliment la mediul minimal. Mediul care a fost suplimentat extensiv se numește mediu complet.

Pentru a studia cantitativ creșterea bacteriană, un inocul bacterian - o cantitate mică de soluție bacteriană, de exemplu , 0,1 sau 1,0 mL - este plasat într-un mediu de cultură lichid. Bacteriile vor prezenta un model de creștere caracteristic, așa cum este ilustrat în Figura 6.1. Inițial, în timpul fazei de lag, creșterea este lentă. Aceasta este urmată de o perioadă de creștere rapidă numită faza logaritmică (logaritmică). În această fază, celulele se divid continuu, cu un interval de timp fix între diviziunile celulare, rezultând o creștere exponențială. Când se atinge o densitate celulară de aproximativ 10^9 celule /mL, nutrienții devin limitanți și celulele se opresc din diviziune; în acest moment, celulele intră în faza staționară. Timpul de dublare în timpul fazei logaritmice poate fi de doar 20 de minute. Prin urmare, un inocul inițial de câteva mii de celule adăugate la cultură poate atinge cu ușurință densitatea celulară maximă în timpul unei incubări peste noapte .

Celulele care cresc într-un mediu lichid pot fi cuantificate prin transferul lor într-o placă Petri care conține un mediu semisolid. După incubare și numeroase diviziuni, fiecare celulă dă naștere unei colonii vizibile la suprafața mediului . Numărul de colonii permite estimarea numărului de bacterii prezente în cultura originală.

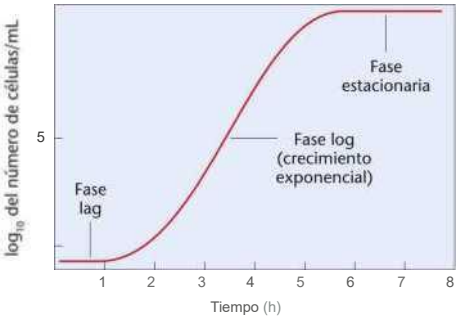


FIGURA 6.1 Curbă tipică de creștere a unei populații bacteriene, care prezintă faza inițială de latență, faza logaritmică ulterioară în timpul căreia are loc o creștere exponențială și faza staționară, care apare atunci când nutrienții au fost consumați. În cele din urmă, toate celulele mor.

Dacă numărul de colonii este prea mare pentru a fi numărat, atunci se pot face diluții (o tehnică numită *diluție serială) ale* culturii lichide originale și se pot inocula până când numărul de colonii este redus la un punct în care acestea pot fi numărate (Figura 6.2). Această tehnică permite calcularea numărului de bacterii prezente în cultura originală.

să presupunem că cele trei vase Petri din Figura 6.2 reprezintă însămânțarea a 1 ml de diluții de 10^3 , 10^{-4} și 10^{-5} (De la stânga la dreapta) ‡. Trebuie doar să selectăm placa pe care se poate număra cu precizie numărul de colonii. Deoarece fiecare colonie provine probabil dintr-o singură bacterie, numărul de colonii înmulțit cu factorul de diluție va reprezenta numărul de bacterii prezente în fiecare mililitru (mL) de

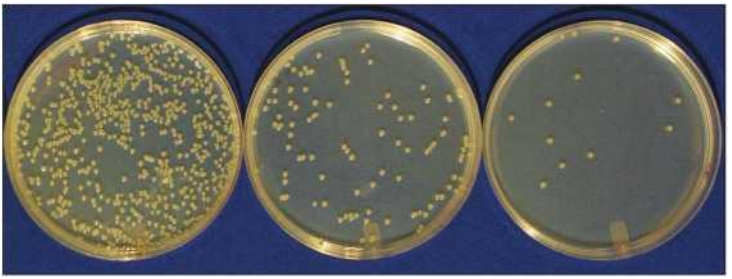


FIGURA 6.2 Rezultatele tehnicii de diluție serială și ale culturii bacteriene ulterioare. Fiecare diluție variază cu un factor de 10. Fiecare colonie este derivată dintr-o singură celulă bacteriană.

‡ 10^5 reprezintă o diluție de 1:100.000

Inoculul inițial, înainte de diluare. În Figura 6.2, placa din dreapta are 12 colonii. Factorul de diluție pentru o diluție de IO_5 este 10^{-5}. Prin urmare, numărul inițial de bacterii a fost de 12 × IO_5 per mililitru.

6.2

Recombinarea genetică are loc la bacterii

Dezvoltarea tehnicilor care au permis identificarea și studierea mutațiilor bacteriene a condus la investigații detaliate privind transferul de informații genetice între organisme individuale. După cum vom vedea, la fel ca în cazul încrucișării meiotice la eucariote, acest proces de recombinare genetică la bacterii oferă baza pentru dezvoltarea metodologiilor de cartografiere a cromozomilor . Este important de subliniat, înainte de a începe, că termenul *de recombinare genetică,* așa cum este aplicat bacteriilor, se referă la *substituția* uneia sau mai multor gene prezente pe cromozomul unei celule cu cele de pe cromozomul altei celule, distincte genetic. Deși acest lucru diferă oarecum de utilizarea noastră a termenului la eucariote - unde descrie încrucișarea care *produce un schimb reciproc* - efectul general este același: informațiile genetice sunt transferate și, ca urmare, genotipul este modificat.

Vom analiza trei procese care determină transferul de informații genetice de la o bacterie la alta: *conjugarea,* transformarea *și transducția.* Împreună , cunoașterea acestor procese ne-a ajutat să înțelegem originea variației genetice între membrii aceleiași specii bacteriene și, uneori, între membrii unor specii diferite . Atunci când transferul de informații genetice are loc între membrii aceleiași specii, folosim termenul de transfer genetic vertical. Când transferul are loc între membrii unor specii bacteriene înrudite, dar diferite, se folosește termenul de transfer genetic orizontal . Procesul de transfer genetic orizontal a jucat un rol semnificativ în evoluția bacteriilor. Adesea, genele implicate în transferul orizontal sunt cele care conferă, de asemenea, avantaje de supraviețuire speciei receptoare. De exemplu, o specie poate transfera gene de rezistență la antibiotice către alte specii. Sau pot fi transferate gene care conferă o patogenitate crescută. Prin urmare, potențialul unor astfel de transferuri este o preocupare majoră în comunitatea medicală . Mai mult, transferul genetic orizontal a fost unul dintre principalii factori în procesul de speciație.

 la bacterii.

Multe, dacă nu toate, speciile bacteriene au fost receptoare de gene de la alte specii.

Conjugarea la bacterii: descoperirea tulpinilor F + și F~

Studiile privind recombinările bacteriene au început în 1946, când Joshua Lederberg și Edward Tatum au arătat că bacteriile suferă conjugare, un proces prin care informația genetică a unei bacterii este transferată și se recombină cu cea a alteia. Experimentele lor inițiale au fost efectuate cu două tulpini auxotrofe multiple (mutante nutriționale) ale tulpinii E. *coli* K12. După cum se arată în Figura 6.3, tulpina A necesita metionină (met) și biotină (bio) pentru a crește, în timp ce tulpina B necesita treonină (thr), leucină (leu) și tiamină (thi). Niciuna dintre tulpini nu a putut crește pe mediu minimal . Cele două tulpini au fost mai întâi placate separat pe mediu suplimentat, iar apoi celulele din ambele tulpini au fost amestecate și crescute împreună timp de mai multe generații. Apoi au fost placate pe mediu minimal. Orice celule bacteriene care au crescut pe mediu minimal ar fi prototrofe. Este foarte puțin probabil ca oricare dintre celulele cu două sau trei gene mutante să fi suferit mutații spontane simultan la toate cele două sau trei loci, rezultând celule de tip sălbatic. Prin urmare , cercetătorii au presupus că orice prototrofe recuperate trebuie să fi apărut ca o consecință a unei forme de recombinare și schimb genetic între cele două tulpini mutante.

În acest experiment, prototrofele au fost recuperate dintr-un raport de $1/10^{-6}$ (adică 10^{-6}) celule însămânțate. Controalele pentru acest experiment au fost celule din tulpinile A și B însămânțate separat în mediu minimal. Nu s-au recuperat prototrofe. Pe baza acestor observații, Lederberg și Tatum au propus că, deși fenomenul era foarte rar, a avut loc o recombinare genetică.

Descoperirile lui Lederberg și Tatum au fost urmate curând de numeroase experimente menite să clarifice natura fizică și baza genetică a conjugării. A devenit rapid clar că diferite tulpini de bacterii erau implicate într-un transfer unidirecțional de material genetic. Când celulele serveau drept donatoare ale unei părți din cromozomul lor, acestea erau numite celule F^{+} (F de la „fertilitate"). Bacteriile receptoare, numite celule F , primesc material cromozomial de la donator (cunoscut acum ca ADN), care se recombină cu o parte din propriul lor cromozom.

Experimentele ulterioare au stabilit că contactul dintre celule era esențial pentru transferul de cromozomi. Bernard Davis a susținut acest concept, proiectând tubul în U Davis în care F' și

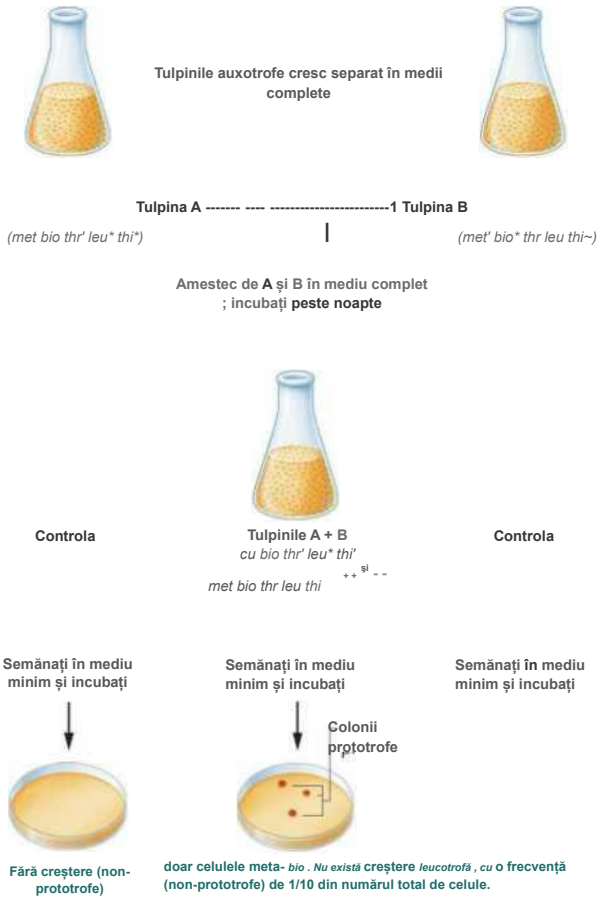

Tulpinile auxotrofe cresc separat în medii complete
Tulpina A ------- ---- ----------1 Tulpina B
(met bio thr' leu* thi*)
(met' bio* thr leu thi~)
Amestec de A și B în mediu complet ; incubați peste noapte
Controla
Tulpinile A + B
cu bio thr' leu* thi'
și
met bio thr leu thi
Controla
Semănați în mediu minim și incubați
Semănați în mediu minim și incubați
Semănați în mediu minim și incubați
Colonii prototrofe
Fără creștere (non-prototrofe)
doar celulele meta- bio . Nu există creștere leucotrofă , cu o frecvență (non-prototrofe) de 1/10 din numărul total de celule.

FIGURA 6.3 Recombinarea între două tulpini auxotrofe care produc prototrofe. Niciuna dintre auxotrofe nu va crește în mediu minimal, dar prototrofele o vor face, ceea ce sugerează că a avut loc recombinarea.

F~ (Figura 6.4). La baza tubului se afla un filtru de porțelan cu o dimensiune a porilor care permitea trecerea mediului lichid, dar era prea mică pentru a permite trecerea bacteriilor. Celulele F* au fost plasate pe o parte a filtrului, iar celulele F_ pe cealaltă. Mediul s-a deplasat de la o parte la alta a filtrului, astfel încât ambele grupuri de celule bacteriene au folosit un mediu comun în timpul incubării.

Davis a inoculat ambele părți ale tubului cu un mediu minim, dar nu s-au recuperat prototrofe, așa că a concluzionat logic că *contactul fizic dintre celulele celor două tulpini este esențial pentru - recombinarea genetică.* Acum știm că această interacțiune fizică este faza inițială a procesului de conjugare și este realizată de o structură numită pilus F (sau pilus sexual; pili), o extensie tubulară a celulei cu o lungime cuprinsă între șase și nouă nanometri *(vezi* fotografia de deschidere a capitolului). Bacteriile au adesea multe tipuri diferite de pili care îndeplinesc funcții celulare diferite, dar toți pili sunt implicați într-un fel în aderență (conexiunea dintre celule). Odată ce contactul între perechile de împerechere s -a stabilit , transferul de cromozomi este posibil.

Ulterior, au apărut dovezi că celulele F' posedau un factor de fertilitate (factor F), care le conferea capacitatea de a dona o parte din cromozomul lor în timpul conjugării. În experimentele efectuate de Joshua

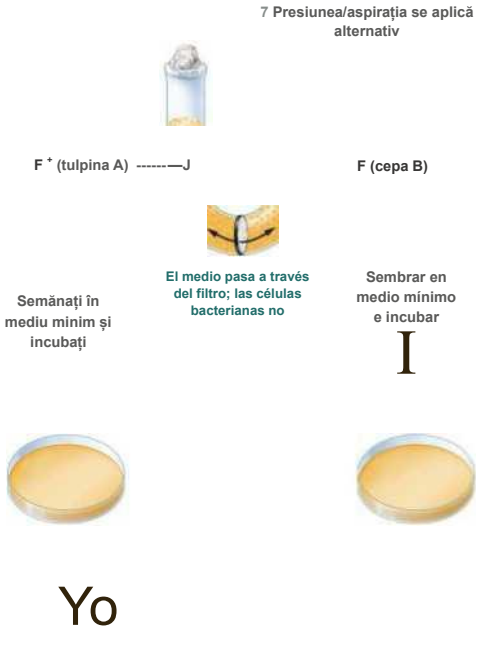

7 Presiunea/aspirația se aplică alternativ
F + (tulpina A) ------—J
F (cepa B)
El medio pasa a través del filtro; las células bacterianas no
Semănați în mediu minim și incubați
Sembrar en medio mínimo e incubar
I
Yo
Sin crecimiento
Sin crecimiento

FIGURA 6.4 Când tulpinile auxotrofe A și B sunt cultivate într-un mediu comun, dar separate printr-un filtru, ca în acest caz

Tubul în U Davis, nu există recombinare genetică și nu se produc prototrofe.

Esther Lederberg, William Hayes și Luca Cavalli-Sforza au demonstrat că anumite condiții de mediu elimină factorul F în celulele anterior fertile. Cu toate acestea, dacă aceste celule „nefertile" au fost cultivate cu celule donatoare fertile, factorul F a fost recuperat. Aceste descoperiri au condus la ipoteza că factorul F este un element mobil, o concluzie susținută în continuare de observația că, după conjugare, celulele receptoare F devin întotdeauna F1 . Astfel, pe lângă cazurile rare de transfer de gene (recombinare genetică) rezultate [din] conjugare , factorul F în sine este transmis *tuturor...* celulele receptoare . În consecință , încrucișările inițiale Lederberg și Tatum (Figura 6.3) pot fi descrise după cum urmează:

Tulpina A		Tulpina B
F +		F~
(DONATOR)	X	(RECEPTOR)

Caracterizarea factorului F a confirmat aceste concluzii . La fel ca și cromozomul bacterian, dar distinct de acesta, s-a demonstrat că factorul F este o moleculă de ADN circulară, bicatenară, echivalentă ca dimensiune cu aproximativ 2% din cromozomul bacterian (aproximativ 100.000 de perechi de nucleotide). Factorul F conține până la 40 de gene distincte. Multe sunt gene trans, ale căror produse sunt implicate în transferul de informații genetice , inclusiv gene esențiale pentru formarea pilusului sexual.

Geneticienii cred că transferul factorului F în timpul conjugării implică separarea celor două catene ale dublei sale spirale și mișcarea unei catene în celula receptoare . Cealaltă catenă rămâne în celula donatoare . Ambele catene - una care trece prin tubul de conjugare și cealaltă care rămâne în celula donatoare - se replică. Drept urmare , atât celulele donatoare , cât și cele receptoare devin F + · Acest proces este ilustrat în Figura 6.5 .

celulele *E. coli* Acestea pot conține sau nu factorul F. Atunci când sunt prezente, celula este capabilă să formeze un pilus sexual și să acționeze potențial ca donator de informații genetice. În conjugare, o copie a factorului F este aproape întotdeauna transferată de la celula F' la celula receptoare F~, devenind astfel F + . Rămânea întrebarea de ce doar o proporție foarte mică din aceste încrucișări (10) au dus și la recombinare genetică. De asemenea, nu era clar ce legătură avea transferul factorului F cu transferul și recombinarea unei anumite gene. Răspunsurile la aceste întrebări depindeau de cercetări ulterioare.

în curând , factorul F este de fapt o unitate genetică autonomă , numită *plasmidă.* Totuși, în relatarea istorică a descoperirii sale din acest capitol, vom continua să ne referim la ea ca la un „factor".

Bacterii Hfr și hărți cromozomiale

Descoperirile ulterioare nu numai că au clarificat modul în care are loc recombinarea genetică , dar au definit și un mecanism de cartografiere a cromozomului E. *coli* . Să analizăm mai întâi problema cartografierii cromozomilor .

În 1950, Cavalli-Sforza a tratat o tulpină F* de *E. coli* K12 cu gaz iperită , o substanță chimică despre care se știe că induce mutații. Din aceste celule tratate , a recuperat o tulpină bacteriană donatoare modificată genetic care a prezentat o rată de recombinare de 1/ 10^4 (sau 10^{-4}), de 1.000 de ori mai mare decât cea a tulpinilor F + · tulpini originale. În 1953, William Hayes a izolat o altă tulpină care a prezentat o frecvență de recombinare similară de mare . Ambele tulpini au fost denumite Hfr (*recombinare de înaltă frecvență ,* (frecvență ridicată de recombinare). Celulele Hfr constituie o clasă specială de celule F

Pe lângă frecvența mai mare de recombinare , a fost observată o altă diferență importantă între tulpinile Hfr și tulpinile F + · originale. Dacă o celulă donatoare aparține unui

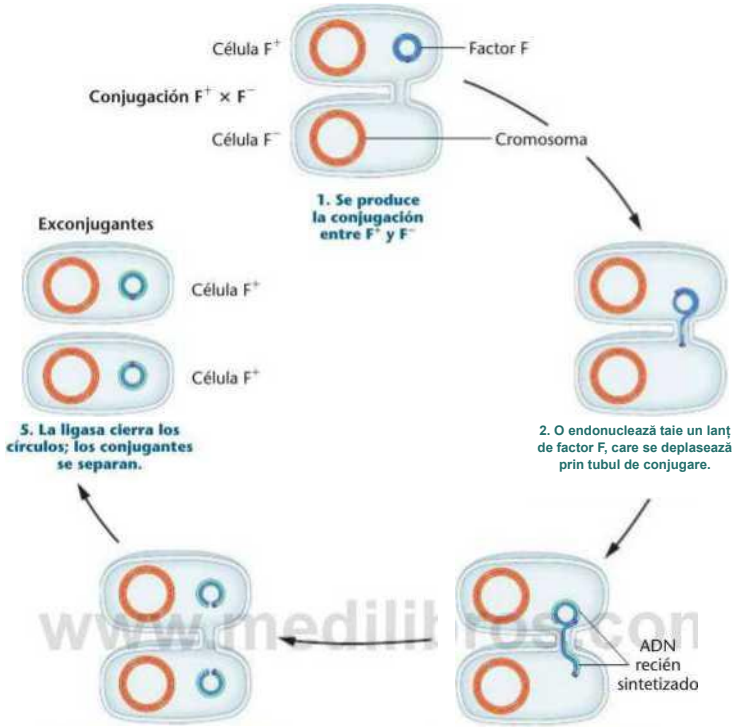

Célula F+
Factor F
Conjugación F+ × F−
Célula F−
Cromosoma
1. Se produce la conjugación entre F+ y F−
Exconjugantes
Célula F+
Célula F+
5. La ligasa cierra los círculos; los conjugantes se separan.
2. O endonuclează taie un lanț de factor F, care se deplasează prin tubul de conjugare.
ADN recién sintetizado
4. Mișcarea prin tubul de conjugare se termină; sinteza ADN-ului este completă.
3. Catena complementară de ADN este sintetizată în ambele catene simple.

FIGURA 6.5 Reprezentarea încrucișată F* x F' care arată cum celula receptoare F devine F *. În timpul conjugării, ADN-ul factorului F este replicat și o nouă copie intră în celula receptoare, transformându-l în F'. Punctele desenate pe factorii F indică rotația lor în sensul acelor de ceasornic în timpul replicării. ADN-ul nou replicat este prezentat într- o nuanță mai deschisă de albastru pe măsură ce factorul F este transferat.

În tulpina Hfr, celulele receptoare, deși uneori prezintă recombinare genetică, *nu devin niciodată Hfr* . Prin urmare , ele continuă să fie F~. Astfel, în comparație, vom avea ,

F + X F — ♦ Receptoarele devin F~
(rată scăzută de recombinare)
Hfr XF“ — * Receptorii rămân ca F~

(rată mare de recombinare)

tulpinilor Hfr este natura *specifică a recombinării.* în fiecare caz. În orice tulpină Hfr dată, anumite gene se recombină mai frecvent decât altele, iar unele nu se recombină deloc. S-a demonstrat că acest model de transfer genetic *non-aleatoriu* variază de la o tulpină Hfr la alta. Deși aceste rezultate au fost enigmatice, Hayes le-a interpretat ca indicând faptul că a avut loc o anumită modificare fiziologică a factorului F, ducând la producerea de tulpini Hfr de *E. coli.*

Pe la mijlocul anilor 1950 , experimentele realizate de Ellie Wollman și François Jacob au explicat diferențele dintre celulele Hfr și F^+. și au demonstrat cum se pot obține hărți cromozomiale ale E. coli folosind celule Hfr . În experimentele lui Wollman și Jacob, tulpinile Hfr și F" rezistente la antibiotice au fost amestecate cu gene marker adecvate, iar recombinarea genelor specifice a fost testată la momente diferite . Pentru a face acest lucru , a fost mai întâi incubată o cultură care conținea un amestec dintr-o tulpină Hfr și o tulpină F" . Probele au fost prelevate la momente diferite

și plasate pe un agitator. Agitarea a oprit conjugarea bacteriilor, întrerupând efectiv transferul de cromozomi . Proba de celule a fost apoi crescută într-un mediu care conținea antibioticul , astfel încât doar celulele receptoare au putut fi recuperate. Aceste celule au fost ulterior analizate pentru a vedea dacă a avut loc transferul de gene specifice .

Acest proces, numit tehnica conjugării întrerupte, a demonstrat că, în funcție de tulpina specifică Hfr, anumite gene au fost transferate și recombinate înaintea altora. Figura 6.6 ilustrează acest lucru. În primele opt minute după amestecarea tulpinilor, nu a fost detectată nicio recombinare. După aproximativ 10 minute, *a fost detectată recombinarea genei azi.* dar transferul genelor tons · *lac* * sau *gal* nu a fost detectat După 15 minute, 50% dintre recombinante erau *azi* ^{R} și 15 % *erau tone* · Totuși, niciuna dintre ele nu a fost *lac~* sau *gal~.* După 20 de minute, a fost găsită gena *lac~* . printre recombinante; până la 25 de minute începuse și transferul/ $^{4.}$ Prin urmare, Wollman și Jacob demonstraseră un *transfer ordonat de gene* care era corelat cu timpul de conjugare.

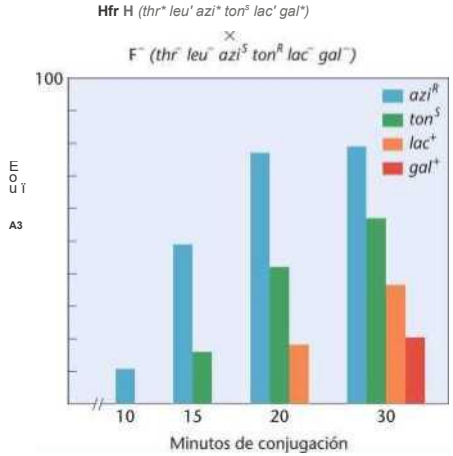


FIGURA 6.6 Transferencia progresiva de diversos genes durante en la conjugación de una cepa Hfr específica de *E. coli* con una cepa F~. Ciertos genes *(azi* y *ton)* se transfieren antes que otros y recombinan más frecuentemente. Otros *(lac y gal)* se transfieren más tarde y los recombinantes se encuentran con una menor frecuencia. Otros *(thry leu)* se transfieren siempre y se utilizaron en la búsqueda inicial de recombinantes, pero no se muestran aquí.

cromozomul bacterian Hfr se transmitea liniar , astfel încât ordinea genelor și distanța dintre ele, măsurată în minute, puteau fi prezise din experimente precum cele realizate de Wollman și Jacob (Figura 6.7). Aceste informații, uneori numite hartă temporală , au servit drept bază pentru prima hartă genetică a cromozomului E. coli . Minutele de pe harta bacteriană oferă o măsură similară cu unitățile de hartă la eucariote.

Wollman și Jacob au repetat același tip de experiment cu alte tulpini Hfr, obținând rezultate similare , dar cu o diferență importantă. Deși genele au fost întotdeauna transferate liniar în timp, ca și în experimentul lor inițial, ordinea în care genele au intrat în receptor părea să varieze de la o tulpină Hfr la alta [Figura 6.8(a)]. Cu toate acestea, când cercetătorii au reexaminat rata de intrare a genelor și, prin urmare, diferitele hărți genetice ale fiecărei tulpini, au detectat un model clar . Principalele diferențe dintre tulpini erau pur și simplu originea (O) - porțiunea cromozomului donator care a fost prima care a intrat în receptor - și direcția în care a avut loc intrarea din acel punct [Figura 6.8(b)].

rezultate , Wollman și Jacob au propus că cromozomul *E. coli* Este circular (un cerc închis, fără capete libere). Dacă originea (O) ar varia de la o tulpină la alta, în fiecare caz s-ar transfera o secvență diferită de gene . Dar ce determină O? Ei au propus că, în diferite tulpini Hfr, factorul F se integrează în cromozom în puncte diferite, iar poziția sa determină situsul O. O astfel de integrare este prezentată în etapa 1 din Figura 6.9 . În timpul conjugării dintre o celulă Hfr și o celulă F, poziția factorului F determină punctul inițial de transfer (etapele 2 și 3). Genele din apropierea lui O sunt transferate primele, iar factorul F este ultima parte care poate fi transferată (etapa 4). Cu toate acestea, conjugarea rareori, dacă nu niciodată, durează suficient de mult pentru a permite întregului cromozom să treacă prin tubul de conjugare .

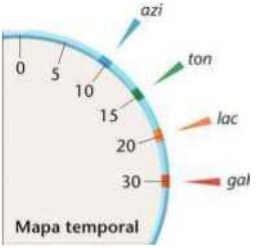


FIGURA 6.7 O hartă temporală a genelor studiate în experimentul ilustrat în Figura 6.6.

(a)

Cepa Hfr	(primero)			Orden de transferencia				(último)
H	*thr* -	*leu* -	*azi*	- *ton* -	*pro* -	*lac* -	*gal* - *thi*	
1	*leu* -	*thr* -	*thi*	- *gal* -	*lac* -	*pro* -	*ton*	- *azi*
2	*pro* -	*ton* -	*azi*	- *leu* -	*thr* -	*thi* -	*gal* - *lac*	
7	*ton* -	*azi* -	*leu*	- *thr* -	*thi* -	*gal* -	*lac* - *pro*	

(b)

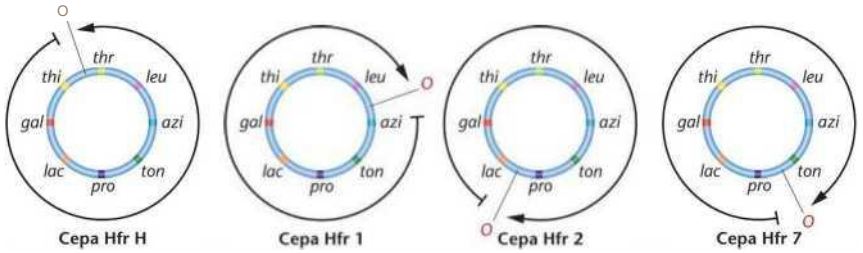


FIGURA 6.8 (a) Ei orden de la transferencia de los genes en cuatro cepas Hfr, el cual sugiere que el cromosoma de E. *coli* es circular, (b) En cada cepa se identifica el punto a partir del cual se origina (O) la transferencia. El origen viene determinado por el punto de integración en el cromosoma del factor F y la dirección de transferencia por la orientación del factor F cuando se integra. Las flechas indican los puntos de transferencia inicial.

(etapa 5). *Această propunere explică de ce celulele receptoare, atunci când sunt încrucișate cu celule Hfr, rămân F~.*

Figura 6.9 ilustrează, de asemenea, modul în care se comportă cele două catene care alcătuiesc o moleculă de ADN donator în timpul transferului, permițând uneia dintre catenele de ADN să intre în receptor (etapa 3). După replicarea în receptor, ADN-ul care a penetrat este acum capabil să se recombine cu regiunea sa omoloagă de pe cromozomul gazdă. Catena de ADN care rămâne în donator este acum, de asemenea, supusă replicării.

Utilizarea conjugării întrerupte cu diferite tulpini Hfr a permis cercetătorilor să construiască o hartă completă a *cromozomului E. coli.* Cartografierea folosind unități de timp, tulpina K12 (sau *E. coli* K12) are o lungime de 100 de minute. În timp ce analiza actuală a genomului cromozomului *E. coli* a stabilit prezența a aproximativ 4.000 de secvențe care codifică proteine, această procedură originală de cartografiere a stabilit locația a aproximativ 1.000 de gene.

încrucișările F + XF~ : o trecere în revistă

Modelul anterior i-a ajutat pe geneticieni să înțeleagă mai bine cum are loc recombinarea genetică în încrucișările F1 x F. Rețineți că în aceste cazuri recombinarea are loc mult mai rar decât în încrucișările Hfr x F' și că transferul de gene este aleatoriu.

AHORA RESUELVA ESTO

6.1 Când tehnica de conjugare întreruptă a fost utilizată cu cinci tulpini diferite de bacterii Hfr , s-a observat următoarea ordine de intrare și recombinare a genelor . Pe baza acestor date, desenați o hartă a cromozomului bacterian. Susțin aceste date conceptul de circularitate?

Tulpina Hfr	Comanda				
1	*T.*	**C.**	*H*	*R*	*SAU*
2	*H*	*R*	*Oh*	*M.*	*B.*
3	*M.*	*Oh*	*R*	*H*	*C.*
4	*M.*	*B.*	*O*	*K.*	*T.*
5	**C.**	*T.*	*K.*	*O*	*B.*

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care cromozomul bacterian este transferat în timpul conjugării, ceea ce permite recombinarea și oferă date pentru cartografierea cromozomilor. Cheia rezolvării acesteia este înțelegerea faptului că transferul de cromozomi este specific tulpinii și depinde de poziția și orientarea integrării factorului F pe cromozom.*

Convingerea actuală este că atunci când celulele F1 și F2 sunt amestecate conjugarea are loc ușor și că fiecare celulă F1 implicată în conjugarea cu o celulă F2 primește o copie a factorului.

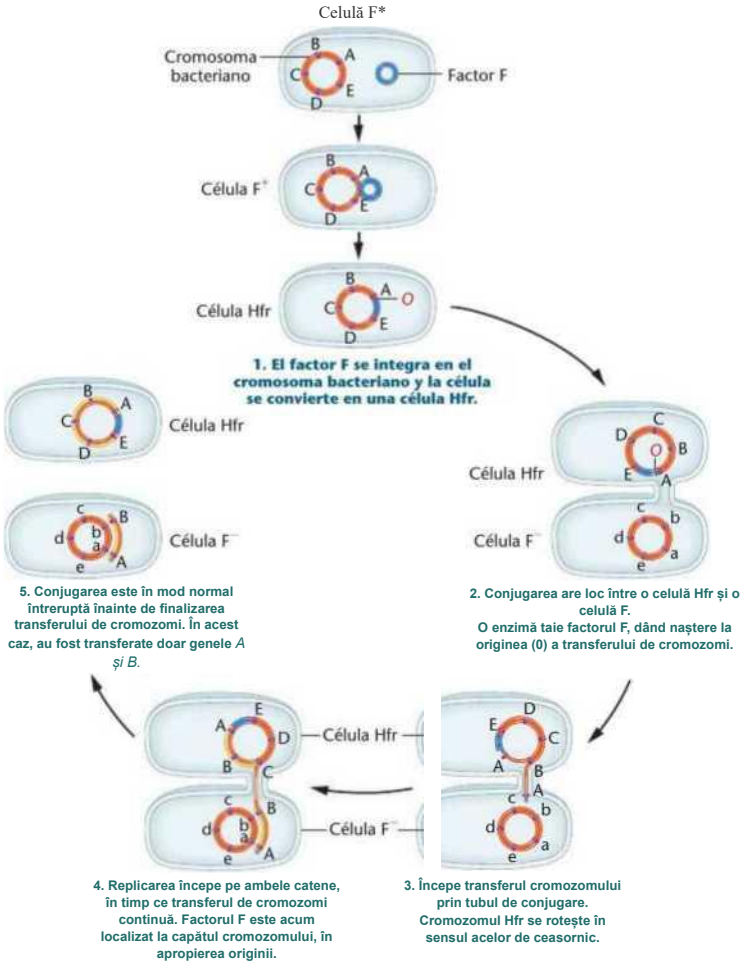

Celulă F*
Cromosoma bacteriano
Factor F
Célula F+
Célula Hfr
1. El factor F se integra en el cromosoma bacteriano y la célula se convierte en una célula Hfr.
Célula Hfr
Célula F−
2. Conjugarea are loc între o celulă Hfr și o celulă F.
O enzimă taie factorul F, dând naștere la originea (0) a transferului de cromozomi.
3. Începe transferul cromozomului prin tubul de conjugare. Cromozomul Hfr se rotește în sensul acelor de ceasornic.
4. Replicarea începe pe ambele catene, în timp ce transferul de cromozomi continuă. Factorul F este acum localizat la capătul cromozomului, în apropierea originii.
5. Conjugarea este în mod normal întreruptă înainte de finalizarea transferului de cromozomi. În acest caz, au fost transferate doar genele *A* și *B*.

FIGURA 6.9 Conversia din starea F în Hfr are loc prin integrarea factorului F în cromozomul bacterian. Situsul de integrare determină originea (O) a transferului. În timpul conjugării, o enzimă scindează factorul F , acum integrat în cromozomul gazdă, inițiind transferul de cromozomi la acel situs. Conjugarea este în mod normal întreruptă înainte de finalizarea transferului . În diagramă, doar genele A și *B* au fost transferate în celula F ; acestea se pot recombina cu cromozomul gazdă. ADN- ul nou replicat al cromozomului este prezentat într - o nuanță mai deschisă de portocaliu .

F, *dar nu are loc nicio recombinare genetică. Cu toate acestea* , într-o populație de celule F^+, factorul F se integrează spontan , la o frecvență extrem de scăzută, în puncte aleatorii de pe cromozomul bacterian, transformând celulele F* în celule Hfr , așa cum se arată în Figura 6.9. Prin urmare, în încrucișările F^+ x F, frecvența extrem de scăzută de recombinare (10^{7}) este atribuită rarelor celule Hfr care se formează, care apoi se conjugă cu celulele F*. Deoarece punctul de integrare al factorului F este aleatoriu , genele transferate de oricare dintre noile celule Hfr donatoare vor *apărea* , *de asemenea, a fi aleatorii în cadrul populației mari de* $F^{+/F*}$. Bacteria receptoare va apărea ca o celulă recombinantă

; de fapt, va fi în continuare F*. Dacă ulterior suferă o conjugare cu o celulă F^+, va deveni F^+.

Starea F' și merozigoții

În 1959, în experimente cu tulpini Hfr de *E. coli,* Edward - Adelberg a descoperit că factorul F își poate pierde condiție integrată, ducând la revenirea la starea F' (etapa 1 din Figura 6.10). Când se întâmplă acest lucru, factorul F ia frecvent cu el mai multe gene bacteriene adiacente (etapa 2). Adelberg a numit această condiție F' pentru a o distinge de F^+ și Hfr. Astfel, F', la fel ca Hfr, este un alt caz special de F^+.

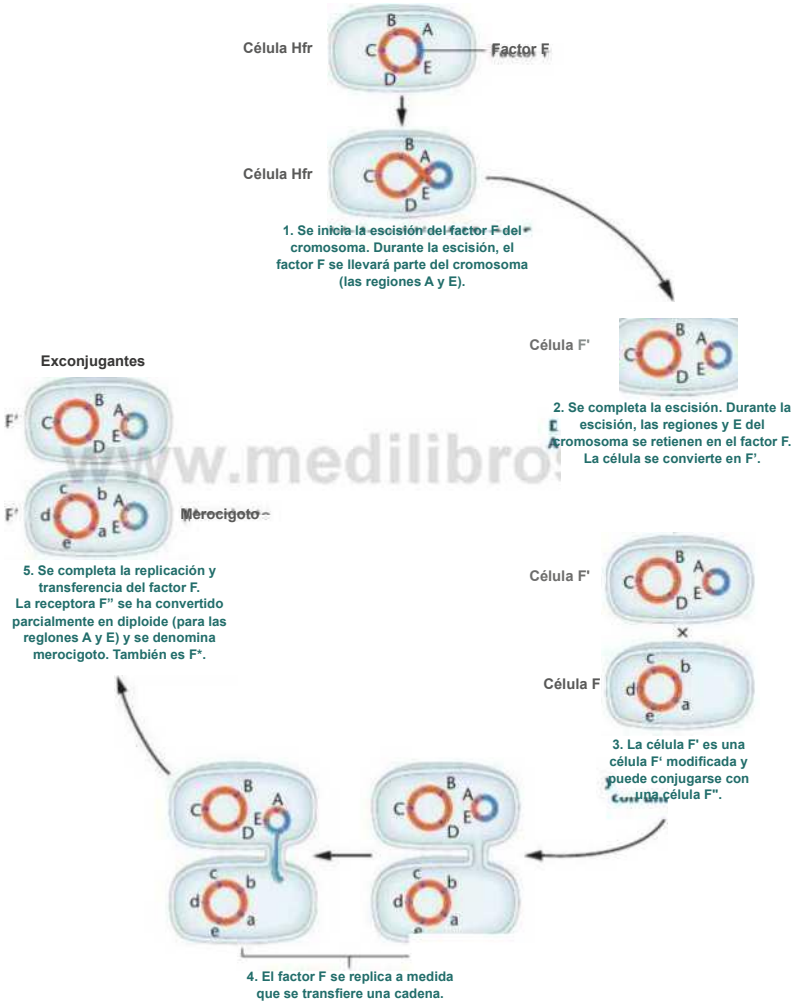

Célula Hfr
Factor F
Célula Hfr
1. Se inicia la escisión del factor F del cromosoma. Durante la escisión, el factor F se llevará parte del cromosoma (las regiones A y E).
Célula F'
2. Se completa la escisión. Durante la escisión, las regiones y E del cromosoma se retienen en el factor F. La célula se convierte en F'.
Exconjugantes
F'
F'
Merocigoto
5. Se completa la replicación y transferencia del factor F. La receptora F'' se ha convertido parcialmente en diploide (para las reglones A y E) y se denomina merocigoto. También es F*.
Célula F'
Célula F
3. La célula F' es una célula F' modificada y puede conjugarse con una célula F".
4. El factor F se replica a medida que se transfiere una cadena.

FIGURA 6.10 Conversión de una bacteria Hfr en F' y su cruce posterior con una célula F . La conversión ocurre cuando el factor F pierde su estado integrado. Durante la escisión del cromosoma, el factor F puede llevarse uno o más genes del cromosoma (en este caso, A y E). Después de la conjugación, la célula receptora se convierte en parcialmente diploide y se denomina merocigoto. También se comporta como una célula donante F'.

Prezența genelor bacteriene în factorul F citoplasmatic duce la o situație interesantă. O bacterie F' se comportă ca o celulă F §prin inițierea conjugării cu celulele F_ (etapa 3 din Figura 6.10). Când se întâmplă acest lucru , factorul F, care conține gene cromozomiale, este transferat către celula F (etapa 4). Drept urmare, orice gene cromozomiale care fac parte din factorul F vor fi acum prezente ca duplicate în celula receptoare (etapa 5), deoarece receptoarea are încă un cromozom complet. Acest lucru are ca rezultat o celulă parțial diploidă, numită merozigot. Se pot stabili culturi pure de merozigoți F'. Acestea au fost extrem de utile în studiul reglării genetice bacteriene, așa cum se va discuta în Capitolul 16.

6.3

Proteinele Rec sunt esențiale pentru recombinarea bacteriană

Odată ce cercetătorii au stabilit că există un transfer unidirecțional de ADN între bacterii, au devenit interesați să determine cum are loc de fapt recombinarea în celula receptoare. Cum înlocuiește ADN-ul donor regiunea omoloagă de pe cromozomul receptorului? Ca în multe sisteme, mecanismul biochimic prin care are loc recombinarea a fost descifrat prin studii genetice. Informații cheie au fost obținute prin izolarea unui grup de mutații care au împiedicat procesul de recombinare, ceea ce a dus la descoperirea genelor *ree* (pentru recombinare).

Prima observație relevantă a vizat o serie de gene mutante numite *recA, recB, recC* și *recD.* Prima genă mutantă, *reeA,* a redus recombinarea genetică la bacterii de aproximativ o mie de ori, eliminând-o aproape complet; aproape toate celelalte mutații *ree* au redus recombinarea de aproximativ 100 de ori. În mod evident, produșii normali de tip sălbatic ai acestor gene joacă un rol esențial în procesul de recombinare .

Cercetătorii au căutat și izolat mai multe produse genetice funcționale prezente în celulele normale, dar absente în celulele *Ree mutante* și au demonstrat că acestea joacă un rol în recombinarea genetică. Primul produs a fost numit proteina RecA* . Această proteină joacă un rol important în

 Recombinarea este legată fie de o singură catenă de ADN, fie de capătul liniar al unei molecule de ADN bicatenar care s-a derulat. Se pare că deplasarea monocatenară este o formă normală de recombinare la multe specii bacteriene. Când ADN-ul bicatenar intră în celula gazdă, o catenă este adesea degradată, lăsând catena complementară ca singură sursă de recombinare. Această catenă trebuie să-și găsească regiunea omoloagă de-a lungul cromozomului gazdă și , odată ce a făcut acest lucru, RecA facilitează recombinarea.

Al doilea produs genetic înrudit este o proteină mai complexă numită RecBCD, o enzimă formată din subunități polipeptidice codificate de celelalte trei *gene ree.* Această proteină este importantă atunci când ADN-ul bicatenar servește drept bază pentru recombinarea genetică. RecBCD desface helixul, facilitând recombinarea în care este implicată RecA. Aceste descoperiri ne-au extins considerabil înțelegerea procesului de recombinare și subliniază importanța izolării mutațiilor, a stabilirii fenotipurilor acestora și a determinării rolului biologic al genelor normale de tip sălbatic. Modelul de recombinare bazat pe descoperirile *ree* se aplică și eucariotelor: proteine eucariote similare cu RecA au fost izolate și studiate. Vom reveni la acest subiect în Capitolul 11, unde vom discuta două modele de recombinare a ADN-ului.

6.4

§Rețineți că numele genelor bacteriene încep cu o literă mică și sunt scrise cu caractere cursive, în timp ce numele produselor genetice corespunzătoare încep cu o literă mare și sunt scrise cu caractere normale. De exemplu, gena *recA* codifică proteina RecA. Genele care sunt, de asemenea, integrate în cromozom sunt adesea numite epizomi.

Plasmidele pot fi clasificate în funcție de informațiile genetice specifice de ADN-ul lor. Plasmida factorului F conferă fertilitate și are gene esențiale pentru formarea pililor sexuali, de care depind conjugarea și recombinarea ulterioară. Plasmidele R și Col sunt alte exemple.

Majoritatea plasmidelor R constau din două componente : factorul de transfer al rezistenței (RTF) și unul sau mai mulți determinanți r (Figura 6.11 (b)). RTF codifică informații genetice esențiale pentru transferul de plasmide între bacterii, iar determinanții r sunt gene care conferă rezistență la antibiotice sau metale grele, cum ar fi mercurul. Deși RTF-urile sunt foarte similare între o serie de plasmide din diferite specii bacteriene , există o mare varietate de determinanți r, fiecare specific pentru rezistența la un anumit tip de antibiotic. Determinanții care conferă rezistență la tetraciclină, streptomicină, ampicilină, sulfanilamidă, kanamicină sau cloramfenicol sunt cei mai comuni. Ocazional, plasmidele conțin mulți determinanți r, conferind rezistență la mai multe antibiotice [Figura 6.11 (b)]. Bacteriile care poartă astfel de plasmide au o mare importanță clinică, nu numai datorită rezistențelor lor multiple, ci și pentru că aceste plasmide pot fi transferate cu ușurință la alte bacterii patogene, ceea ce le face rezistente la o gamă largă de antibiotice.

Primul caz cunoscut al acestui tip de plasmidă a apărut în Japonia în anii 1950 , la bacteria *Shigella* , care provoacă dizenterie. În spitale au fost izolate bacterii rezistente la până la cinci dintre antibioticele menționate anterior . Evident, acest fenomen reprezintă o amenințare semnificativă la adresa sănătății . Din fericire , celulele bacteriene conțin uneori...

Factorul F este un exemplu de plasmidă

În secțiunile precedente, am introdus unitatea ereditară extracromozomală numită factor F, de care bacteriile au nevoie pentru conjugare . Atunci când există autonom în citoplasma bacteriană , acest factor este compus dintr - o buclă închisă de ADN bicatenar . Aceste caracteristici plasează factorul F într -o categorie mai generală de structuri genetice numite plasmide. [Figura 6.11(a)] În citoplasmă, sunt de obicei prezente copii multiple de plasmide ; fiecare poate conține una sau mai multe gene și adesea conține mai multe. Replicarea lor depinde de aceleași enzime care replică cromozomul celulei gazdă și , în timpul diviziunii celulare, acestea sunt distribuite celulelor fiice împreună cu cromozomul gazdă. În majoritatea cazurilor , celula are copii multiple ale fiecărui tip de plasmidă pe care o posedă. Multe plasmide sunt limitate la citoplasma celulei bacteriene . Altele, cum ar fi factorul F, se pot integra în cromozomul gazdă . Plasmidele care pot exista autonom sau

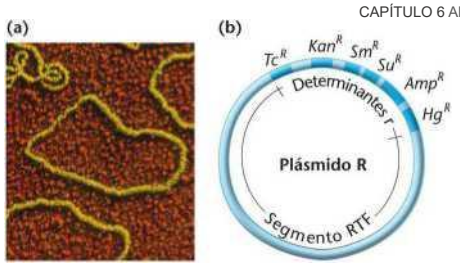


FIGURA 6.11 (a) Micrografie electronică a unei plasmide izolate din *E. coli,* (b) Plasmidă R cu factor de transfer de rezistență (RTF) și determinanți *r* multipli (Te, tetraciclină; Kan, kanamicină; Sm, streptomicină; Su, sulfonamidă; Ap, ampicilină; și Hg, mercur).

determinanți r , dar fără RTF. Deși o astfel de celulă este rezistentă, nu poate transfera informațiile genetice pentru rezistență către alte celule receptoare. Cu toate acestea, plasmidele cel mai frecvent studiate conțin atât RTF, cât și unul sau mai mulți determinanți r.

Plasmida Col, ColEl (derivată din *E. coli),* este distinct diferită de plasmidele R. Aceasta codifică una sau mai multe proteine care sunt extrem de toxice pentru tulpinile bacteriene care nu poartă aceeași plasmidă. Aceste proteine, numite colicine, pot ucide bacteriile vecine. Cele care poartă plasmida se consideră a fi *colicinogene.* Plasmida Col, prezentă în 10 până la 20 de copii pe celulă, are și o genă care codifică o proteină imună ce protejează celula gazdă de toxină . Spre deosebire de plasmidele R, plasmida Col nu este de obicei transmisibilă altor celule.

Interesul pentru plasmide a crescut enorm datorită rolului lor în tehnologia ADN-ului recombinant . După cum vom vedea în Capitolul 20, gene specifice din orice sursă pot fi inserate în plasmide, care pot fi apoi inserate într-o celulă bacteriană. Când celula modificată își replică ADN-ul și suferă diviziune, gena străină este, de asemenea, replicată, clonându-se astfel genele .

Transformarea este un al doilea proces care are ca rezultat recombinarea genetică la bacterii

Transformarea este un proces care oferă și un mecanism pentru recombinarea informației genetice la unele bacterii. În transformare, mici bucăți de ADN extracelular (exogen) sunt încorporate într-o bacterie vie, rezultând în cele din urmă o modificare genetică stabilă în celula receptoare. În acest capitol, suntem interesați în mod special de transformare deoarece, la speciile bacteriene la care are loc, procesul poate fi utilizat pentru a cartografia genele bacteriene (deși într-un mod mai limitat decât conjugarea). După cum vom vedea în Capitolul 10, transformarea a fost, de asemenea, esențială în stabilirea faptului că ADN-ul este materialul genetic. În plus, în studiile ADN-ului recombinant (Capitolul 20), transformarea, sau cel puțin o versiune îmbunătățită artificial folosind *electroporarea* (curent electric), este fundamentală pentru clonarea genelor.

Procesul de transformare

Procesul de transformare (Figura 6.12) constă în numeroși pași care au ca rezultat două rezultate de bază: (1) intrarea ADN -ului străin într-o celulă receptoare și (2)

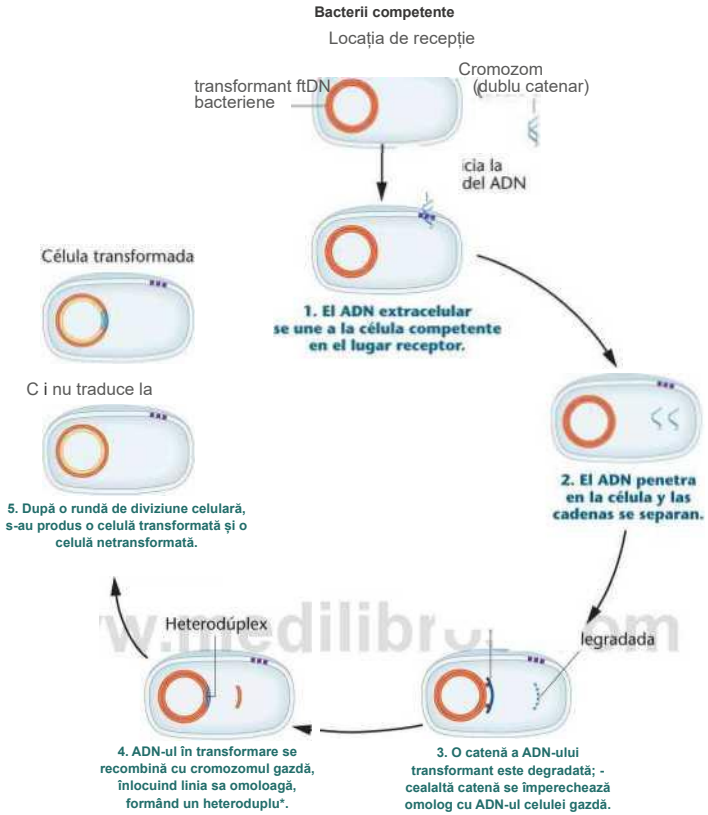


FIGURA 6.12 Etape propuse care duc la transformarea unei bacterii prin ADN exogen. Una dintre cele două catene de ADN primite este implicată în transformare, care se finalizează după diviziunea celulară.

recombinare între ADN-ul străin și regiunea sa omologă de pe cromozomul receptor. Deși recombinarea genetică necesită ca

ambele rezultate să fie finalizate, prima etapă a transformării poate fi efectuată fără a doua , rezultând adăugarea de ADN străin la citoplasma bacteriană, dar nu și la cromozomul său.

Într-o populație de celule bacteriene, doar acele celule aflate într-o anumită stare fiziologică de competență acceptă ADN-ul. Studiile au arătat că diverse tipuri de bacterii se transformă în mod natural (de exemplu, *Haemophilus influenzae , Bacillus subtilis, Shigella paradysenteriae, Streptococcus pneumoniae și E. coti).* Alte tipuri de bacterii pot fi induse în laborator pentru a deveni competente . Se crede că intrarea ADN-ului are loc printr-un număr limitat de situsuri receptori de pe suprafața unei celule bacteriene competente (Figura 6.12, etapa 1). De asemenea, se crede că intrarea în celulă este un proces activ, care necesită energie și molecule de transport specifice. Acest model este susținut de faptul că substanțele care inhibă producția de energie sau sinteza proteinelor inhibă, de asemenea, transformarea.

La scurt timp după intrare, una dintre cele două catene ale dublei spirale este digerată de nucleaze, rămânând doar o catenă care să participe la transformare (Figura 6,12, etapele 2 și 3). Catena de ADN supraviețuitoare se aliniază cu regiunea complementară a cromozomului bacterian. Într-un proces care implică mai multe enzime, acest segment de ADN înlocuiește regiunea omoloagă a cromozomului (etapa 4), care este scindată și degradată.

Pentru ca recombinarea să fie detectată, ADN -ul transformant trebuie să provină dintr-o tulpină bacteriană diferită, care prezintă o anumită variație genetică distinctă, cum ar fi o mutație. Odată integrată în cromozom, regiunea recombinantă conține o catenă gazdă (prezentă inițial) și o catenă mutantă. Deoarece aceste catene au origini diferite, regiunea se numește heteroduplex și conține de obicei o nepotrivire de baze. Această nepotrivire declanșează un proces de reparare *(vezi* Capitolul 15). După reparare și o rundă de replicare a ADN-ului, un cromozom va fi restaurat la secvența sa originală de ADN, identică cu cea a celulei receptoare originale, în timp ce celălalt va conține gelul mutant aliniat corespunzător. După diviziunea celulară, se generează o celulă netransformată (non-mutantă) și o celulă transformată (mutantă), așa cum este descris în etapa 5.

Transformare și gene legate

În studiile timpurii de transformare, cel mai eficient ADN exogen avea o dimensiune cuprinsă între 10.000 și 20.000 de perechi de nucleotide, o lungime suficientă pentru a codifica mai multe gene. Genele care sunt adiacente sau foarte apropiate una de cealaltă pe cromozomul bacterian pot fi găsite într-un singur fragment de această dimensiune. Din această cauză, o transformare poate duce la cotransformarea simultană a mai multor gene. Genele care sunt suficient de apropiate pentru a fi cotransformate se spune că sunt legate. Spre deosebire de *grupurile de legătură* din eucariote, care sunt compuse din toate genele situate pe același cromozom, rețineți că aici termenul de legătură *se referă* la gradul de proximitate dintre gene care permite cotransformarea (adică genele sunt situate foarte aproape una de cealaltă).

Dacă două gene nu sunt legate, transformarea simultană poate avea loc doar ca urmare a două evenimente de transformare independente care implică două segmente distincte de ADN . Ca și în cazul dublei încrucișări la eucariote, probabilitatea ca două evenimente independente să aibă loc simultan este egală cu produsul probabilităților lor individuale. Prin urmare, frecvența transformării simultane între două gene nelegate este mult mai mică decât dacă acestea ar fi legate. În anumite condiții, distanțele relative dintre genele legate pot fi determinate din datele de transformare , analog procesului de cartografiere a cromozomilor la eucariote, deși în acest caz procesul este oarecum mai complex.

„Astăzi, știm că o lungime a ADN-ului de 2000 de perechi de nucleotide este extrem de eficientă în experimentele de clonare a genelor."

ACUM REZOLVĂ ASTA |

6.2 Într -un experiment de transformare cu o tulpină bacteriană receptoare de genotip *a'b',* Au fost *obținute* următoarele rezultate . Ce se poate concluziona despre localizarea genelor ? și *b* unul în raport cu celălalt?

	Transformatoare (%) *a~b**		
transformarea ADN-ului	*a*b~*		
	3.1	1.2	0,04
a' b și *a' b'*	2.4	1.4	0,03

■ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea modului în care transformarea poate fi utilizată pentru a determina dacă anumite gene bacteriene sunt strâns legate. Ni se cere să prezicem locația genelor una față de cealaltă. Cheia rezolvării problemei este înțelegerea faptului că cotransformarea (a două gene) are loc conform legilor probabilității. Două gene nelegate se vor transforma numai ca urmare a a două evenimente independente. Într-un astfel de caz, probabilitatea ca acest lucru să se întâmple este egală cu produsul probabilităților individuale.*

6.6 Bacteriofagii sunt virusuri bacteriene

■

Bacteriofagii, sau fagii așa cum sunt cunoscuți în mod obișnuit , sunt virusuri care parazitează bacteriile. Replicarea fagilor poate duce la o altă formă de recombinare genetică bacteriană numită transducție. Pentru a înțelege acest proces , trebuie să luăm în considerare mai întâi genetica bacteriofagilor , deoarece aceștia înșiși pot suferi recombinare.

s-au efectuat numeroase cercetări genetice . În această secțiune, vom examina mai întâi structura și ciclul de viață al unui tip de bacteriofag. Apoi vom discuta modul în care acești fagi sunt studiați atunci când infectează bacteriile. În cele din urmă, vom compara două posibile moduri de comportament odată ce infecția cu fagi a început . Aceste informații vor forma baza pentru discuția noastră ulterioară despre transducție și recombinare în bacteriofagi .

Fagul T4: structură și ciclu de viață

Bacteriofagul T4 aparține unui grup de virusuri înrudite cu bacteriofagii, numiți fagi T cu număr par. Are o structură complexă, așa cum se arată în Figura 6.13. Materialul său genetic, ADN-ul, este închis într-un înveliș proteic icosaedric (un poliedru cu 20 de fețe) care formează capul virusului. Există suficient ADN pentru a codifica peste 150 de gene de dimensiuni medii . Capul este conectat la o coadă care are un guler și o teacă contractilă care înconjoară o axă centrală.

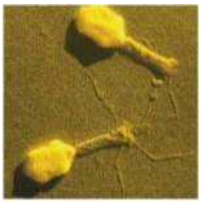


FIGURA 6.13
Fago T4 maduro

Structura bacteriofagului T4, incluzând un cap icosaedric, umplut cu ADN; o coadă formată dintr-un guler, un tub și o teacă; *și* o placă de bază cu fibrele cozii. În timpul asamblării, componentele cozii sunt adăugate la cap, apoi sunt adăugate fibrele cozii.

Apar fibre, care au la capete locuri de atașare ce recunosc în mod specific zone specifice ale suprafeței exterioare a peretelui celular al bacteriei gazdă E. *cali.*

Ciclul de viață al fagului T4 (Figura 6.14) începe atunci când virusul se atașează de celula gazdă bacteriană prin adsorbție. Apoi, se emit ipoteza că o contracție a tecii caudale , care necesită ATP , determină axa centrală să penetreze peretele celular. ADN-ul capului este injectat , traversând membrana celulară în citoplasma bacteriană. În câteva minute , tot ADN-ul , ARN-ul și sinteza proteinelor din bacterie este inhibată, iar sinteza moleculelor virale începe. Simultan , începe degradarea ADN-ului gazdă .

Infecția este caracterizată printr-o perioadă de activitate genetică virală intensă . Inițial, are loc replicarea ADN- ului fagic, rezultând un set de molecule de ADN viral . Apoi, se sintetizează capul, coada și fibrele cozii. Asamblarea virusurilor mature este un proces complex care a fost studiat pe larg de William Wood, Robert Edgar și alții. Au loc trei procese secvențiale: (1) ADN-ul este ambalat atunci când capetele virale sunt asamblate, (2) coada este atașată și (3) fibrele cozii sunt adăugate. Odată ce ADN -ul a fost ambalat în cap , această structură se combină cu componentele cozii , la care se adaugă fibrele cozii . Asamblarea completă este o combinație de autoasamblare și procese dirijate de enzime.

Odată ce au fost formate aproximativ 200 de virusuri noi, celula bacteriană este lizată prin acțiunea lizozimului (un produs al unei gene fagice), iar fagii maturi sunt eliberați din celula gazdă. Această etapă a infecției se numește liză și completează ceea ce este cunoscut sub numele de ciclu litic. Noii fagi de 20^{12} vor infecta apoi alte celule bacteriene disponibile, iar procesul se va repeta.

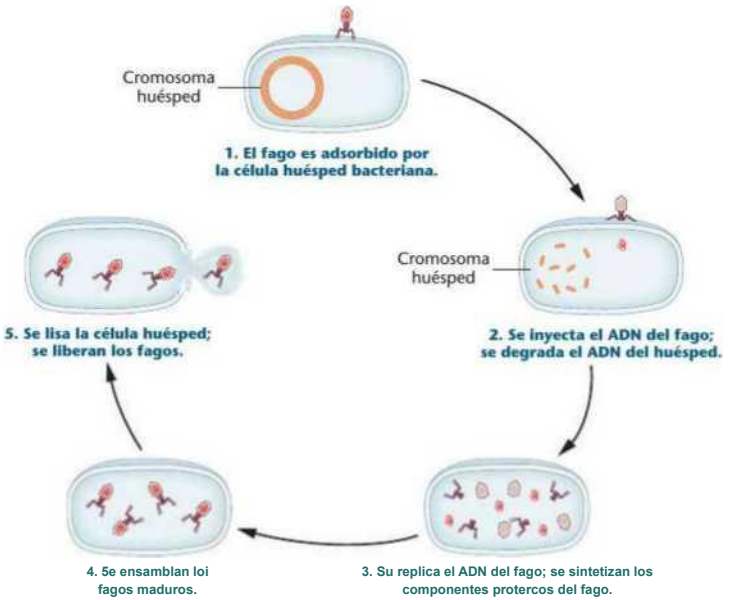

Cromosoma huésped
1. El fago es adsorbido por la célula huésped bacteriana.
Cromosoma huésped
2. Se inyecta el ADN del fago; se degrada el ADN del huésped.
3. Su replica el ADN del fago; se sintetizan los componentes protercos del fago.
4. 5e ensamblan loi fagos maduros.
5. Se lisa la célula huésped; se liberan los fagos.

FIGURA 6.14 Cicla biológica del bacteriófago T4.

Analiza cheliei

Bacteriofagii și alți virusuri au jucat un rol crucial în înțelegerea geneticii moleculare . Cantități enorme de bacteriofagi pot fi obținute pentru cercetarea infecțiilor bacteriene . Adesea, peste 10^{10} virusuri sunt produse per mililitru de mediu de cultură. Multe studii genetice se bazează pe capacitatea noastră de a determina numărul de fagi produși după infecție în condiții specifice de cultură. Analiza plăcilor, utilizată în mod obișnuit în acest scop, este esențială pentru analiza cantitativă în timpul studiilor de mutație și recombinare a bacteriofagilor.

Această analiză este ilustrată în Figura 6.15, care prezintă și morfologia reală a zonelor cu chelie. Se efectuează o diluție serială a culturii bacteriene infectate cu virusul original. O probă de 0,1 mL (o alicotă, adică o parte fracțională) dintr-o diluție este apoi adăugată la un volum mic de agar nutritiv topit (aproximativ 3 mL) la care s-au adăugat câteva picături dintr-o cultură bacteriană sănătoasă. Soluția este apoi turnată ușor pe o bază solidă de agar nutritiv într - o placă Petri și lăsată să se solidifice înainte de incubare. În cazul în care un singur virus a infectat inițial o bacterie din cultură (peluza bacteriană) care a crescut în timpul incubării , apare o zonă clară numită zonă cu chelie . Zona cu chelie reprezintă clone ale unui singur bacteriofag care a cauzat infecția, care sunt create pe măsură ce ciclurile de replicare se repetă. Dacă factorul de diluție este prea scăzut, vor apărea multe zone cu chelie, iar acestea se pot contopi, lizează întreaga peluză bacteriană. Acest lucru s-a întâmplat la - diluția $^{de\ 10^{-J}}$ din Figura 6.15. Totuși, dacă factorul de diluție este crescut corespunzător, petele cu chelie pot fi numărate, permițând estimarea densității virusului în cultura inițială .

$$\text{Densitatea} = \text{(numărul de zone cutanate/mL)} \times \text{factorul inițial de fagi de diluție)}$$

Figura 6.15 arată că s-au dezvoltat 23 de plăci de fagi din alicota de 0,1 mL a diluției de 10^{-5} . Prin urmare, putem estima o densitate de 230 fagi/mL *pentru această diluție* (deoarece alicota inițială a fost de 0,1 mL). Densitatea inițială a fagilor în proba nediluată, având în vedere că am observat 23 de plăci din 0,1 mL a ^{diluției} de 10^{-5} , este calculată folosind

$$\text{Densitate număr inițial de fagi} = (230 \text{ mL}) \times (10^{5}) = (230 \times 10^{e})/\text{mL}$$

Întrucât această valoare este derivată din diluția de 10^{5} , putem estima, de asemenea, că vor exista doar 0,23 fagi/0,1 mL în diluția de 10^{-7} . Prin urmare, dacă am repeta testul cu 0,1 mL din acest tub, am putea prezice că nu vor fi prezente particule de fagi . Această predicție este ilustrată în Figura 6.15, care arată o peluză bacteriană intactă , fără pete de chelie . Factorul de diluție este pur și simplu prea mare .

Utilizarea analizei cheliei a fost indispensabilă în studiile mutaționale și de recombinare a bacteriofagilor . Mai târziu în acest capitol , vom aplica această tehnică mai direct când vom discuta elegantele analize genetice ale lui Seymour Benzer asupra unei gene a fagului T4 .

Lizogenie

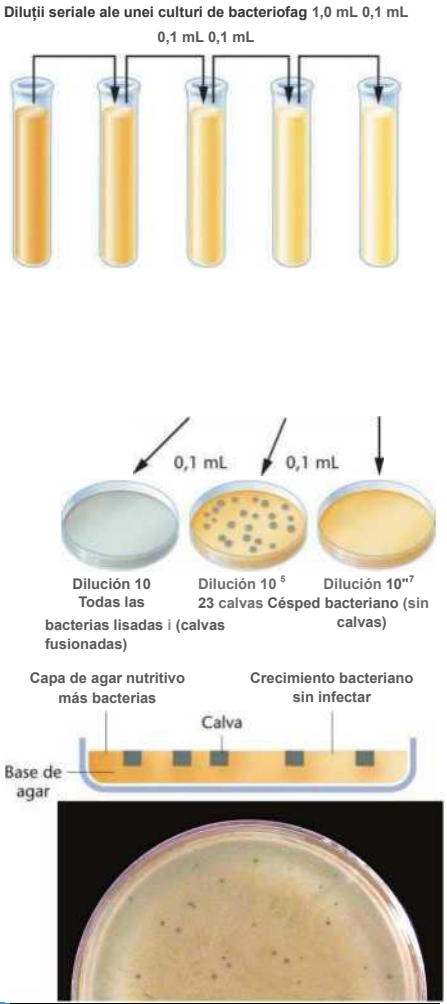
Infectarea unei bacterii cu un virus nu are întotdeauna ca rezultat replicarea și liza virală . Încă din anii 1920 , se știa că un virus putea pătrunde într - o bacterie și coexista cu aceasta. Astăzi, înțelegem bine baza moleculară precisă a acestei relații. Odată ajuns în interior , ADN -ul viral, în loc să se replice în citoplasma bacteriană , se integrează în cromozomul bacterian ; această integrare caracterizează etapa de dezvoltare numită lizogenie . Ulterior, de fiecare dată când cromozomul bacterian se replică, ADN-ul viral se replică și el și este transmis celulelor bacteriene fiice după diviziune. Nu se produc virusuri noi și nu există liză a celulelor bacteriene . Cu toate acestea , ca răspuns la anumiți stimuli, cum ar fi tratamentul cu substanțe chimice sau lumină ultravioletă , ADN-ul viral își pierde starea integrată și inițiază replicarea , producerea de noi virusuri și liza bacteriei .

Pentru a descrie această relație se folosesc termeni diferiți . ADN-ul viral integrat în cromozomul bacterian se numește profag . Virusurile care pot fie liza celula , fie se pot comporta ca profage se numesc fagi atenuați. Cei care pot doar liza celula se numesc fagi virulenți . O bacterie care adăpostește un profag a fost lizogenizată și se spune că este lizogenă; adică este capabilă de a fi lizată ca o consecință a replicării virale induse . ADN-ul viral (cum ar fi factorul F discutat anterior) este clasificat ca *epitom* . Aceasta înseamnă că este o moleculă genetică care se poate replica în citoplasma unei celule sau ca parte a cromozomului acesteia.

pBH

Transducția este transferul ADN-ului bacterian prin intermediul unui virus

În 1952, Norton Zinder și Joshua Lederberg investigau posibila recombinare la bacteria Salmonella typhimurium . Deși au recuperat prototrofe din culturi



Volum total	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Diluare	0	10 1	10 3	10-'	10' 7
Factorul de diluție	0	10	10'	10 dolari	10 7

FIGURA 6.15 Testul de chelire pentru analiza bacteriofagului. Mai întâi se prepară diluții seriale ale unei culturi bacteriene infectate cu bacteriofag . Apoi, se analizează trei diluții (10^{-3} , 10^{-3}) · și 10^{*7}) folosind tehnica de analiză a cheliei . Fiecare chelie reprezintă infecția inițială a unei celule bacteriene de către un

bacteriofag. În diluția de 10^3 Sunt prezenți atât de mulți fagi încât toate bacteriile se lizează. La diluția $^{de\ 10^2}$ Se produc 23 de plăci . La diluția de 10^{-1} , factorul de diluție este atât de mare încât nu există fagi prezenți în proba de 0,1 mL, deci nu se formează plăci . Din proba de 0,1 mL a diluției de 10^{-1} , calculăm densitatea inițială a bacteriofagilor , care rezultă $^{a\ fi}$ 23 x 10^{-11} x 10^{-8}. fagi/mL (230 x $10^{\ s}$). Fotografia prezintă pete goale de fagi T2 pe peluze de E. *coli*.

În amestecuri de două tulpini auxotrofe diferite, investigații ulterioare au relevat că recombinarea nu se datora prezenței unui factor F sau conjugării, așa cum se întâmplă în *E. coli.* Ceea ce au descoperit a fost un proces de recombinare bacteriană prin bacteriofagi, pe care îl numim acum transducție .

Experimentul Lederberg-Zinder

Lederberg și Zinder au amestecat tulpinile auxotrofe *de Salmonella LA-22 și LA-2* și au recuperat celule prototrofe atunci când amestecul a fost plantat pe mediu minimal. Tulpina LA-22 nu a putut sintetiza aminoacizii fenilalanină și triptofan *(phe trp~)* , iar LA-2 nu a putut sintetiza aminoacizii metionină și histidină *(met~ his~).* Celulele prototrofe *(phe $^{+}$ trp* met $^{+}$ his $^{+}$)* au fost recuperate cu o rată de aproximativ 1/ 10^{5} (sau 10^{5}) celule.

Deși aceste observații au sugerat inițial că tipul de recombinare care are loc era cel observat anterior la conjugarea tulpinilor *de E. coli ,* experimentele care au utilizat tubul Davis în U au demonstrat contrariul (Figura 6.16). Cele două tulpini auxotrofe au fost separate printr-un filtru de porțelan, prevenind astfel contactul dintre tulpini, dar permițând creșterea într-un mediu comun. În mod surprinzător, atunci când probele au fost prelevate de pe ambele părți ale filtrului și placate independent pe medii minimale, prototrofele au fost recuperate, dar numai de pe partea tubului care conține bacteria LA-22. Reamintim că, dacă conjugarea ar fi fost responsabilă, ar fi fost de așteptat ca recombinarea să fie prevenită prin utilizarea tubului Davis în U (a se vedea Figura 6.4).

Întrucât celulele LA-2 păreau a fi originea noii informații genetice *(phe* și trp),* cum s-a întâmplat acest lucru?

Presiunea/sucția se aplică alternativ
Tulpina LA-2
(phe~ trp' și-a întâlnit
Mediul trece celulele nu
prin filtru;
Cepa LA-22 (phe trp met' his')
Sembrar en medio mínimo e incubar
Sembrar en medio mínimo e incubar
Creșterea prototrofelor
(phe' trp' met' Ms')
Sin crecimientos (no hay protótrofos)

FIGURA 6.16 Experimentul Lederberg-Zinder folosind *Salmonella.* După plasarea a două tulpini auxotrofe pe laturile opuse ale unui tub Davis în U, Lederberg și Zinder au recuperat prototrofe pe partea care conținea tulpina LA-22, dar nu și pe partea care conținea LA-2. Modul în care informațiile au traversat filtrul de la celulele LA-2 la celulele LA-22, permițând recombinării , a rămas un mister. Sursa necunoscută a fost desemnată pur și simplu ca agent filtrabil (FA).

Trei observații au fost utilizate pentru a identifica fibrilația atrială:

1. AF a fost produs în celulele LA-2 numai atunci când acestea au fost cultivate în asociere cu celule LA-22 . Dacă celulele LA-2 au fost cultivate independent și mediul lor de cultură a fost adăugat la celulele LA - 22 , nu a avut loc nicio recombinare . Prin urmare, celulele LA-22 au jucat un rol în producerea de AF de către celulele LA -2 și au făcut -o numai atunci când cele două tulpini au folosit un mediu comun .
2. Adăugarea de DNază, care digeră enzimatic ADN-ul, nu a făcut ca AF să fie ineficientă. Prin urmare, AF nu este ADN exogen , ceea ce împiedică mecanismul de recombinare să fie transformarea .
3. A F nu a putut trece prin filtrul Davis în formă de U atunci când dimensiunea porilor a fost redusă sub dimensiunea bacteriofagilor .

Ajutați de aceste observații și știind că fagii atenuați pot lizogeniza *Salmonella,* cercetătorii *au* propus că recombinarea *genetică a fost mediată* de bacteriofagul P22, prezent inițial ca profag pe cromozomul celulelor de Salmonella . LA-22. S-a emis ipoteza că, ocazional, prophagii P22 intrau în faza vegetativă sau litică, se reproduceau și erau eliberați de celulele LA-22. Deoarece acești fagi P22 sunt mult mai mici decât o bacterie , treceau prin filtrul în formă de U și ulterior infectau și lizau unele dintre celulele LA - 2 . În procesul de liză LA -2 , fagii P22 împachetau ocazional o regiune a ^{cromozomului} LA -2 în capetele lor . Dacă această regiune conținea genele *phe4* și trp $^{+}$, iar dacă fagii care au trecut ulterior prin filtru ar infecta celulele LA-22, aceste celule nou lizogenizate s-ar comporta ca prototrofe. Acest proces de transducție, prin care are loc recombinarea bacteriană prin intermediul unui bacteriofag , este schematizat în Figura 6.17.

Natura transducției

noi au relevat existența fagilor transducători și la alte specii de bacterii. De exemplu, *E. coli.* poate fi transdusă de fagul TI, în timp ce *Bacillus subtilis* și *Pseudomonas aeruginosa* Acestea pot fi transduse de fagii SPO1 și respectiv F1 . Detaliile diferitelor moduri de transducție au fost , de asemenea, stabilite. Deși descoperirea inițială a transducției a implicat un fag atenuat și o bacterie lizogenă, același proces poate avea loc într-un ciclu litic normal . Ocazional , un mic fragment de ADN bacterian este...

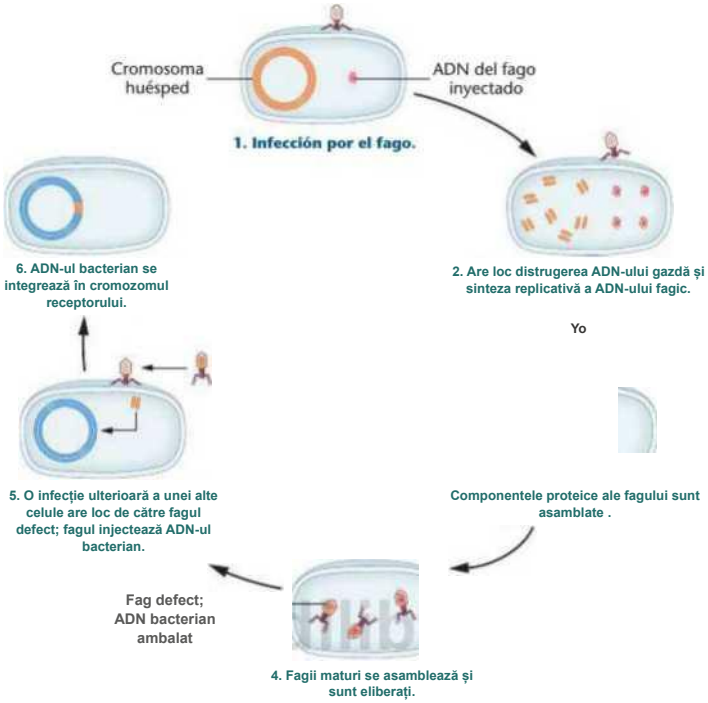

Cromosoma huésped
ADN del fago inyectado
1. Infección por el fago.
2. Are loc distrugerea ADN-ului gazdă și sinteza replicativă a ADN-ului fagic.
Yo
Componentele proteice ale fagului sunt asamblate .
4. Fagii maturi se asamblează și sunt eliberați.
Fag defect; ADN bacterian ambalat
5. O infecție ulterioară a unei alte celule are loc de către fagul defect; fagul injectează ADN-ul bacterian.
6. ADN-ul bacterian se integrează în cromozomul receptorului.

FIGURA 6.17 Transducție generalizată.

Se împachetează *împreună cu sau în locul* cromozomului viral , astfel încât fagul transducător conține fie ADN bacterian, cât și ADN viral, fie doar ADN bacterian . În ambele cazuri, doar câteva gene bacteriene sunt prezente în fagul transducător, deși capul fagului poate conține până la 1 % din cromozomul bacterian. În ambele cazuri, capacitatea de a infecta o celulă gazdă nu are legătură cu tipul de ADN prezent în capul fagului care permite transducția.

de ADN viral, este injectat în celula gazdă , acesta poate rămâne în citoplasmă sau se poate recombina cu regiunea omologă a cromozomului bacterian. Dacă ADN-ul bacterian rămâne în citoplasmă, nu se va replica, ci va fi transmis uneia dintre celulele fiice după fiecare diviziune . Când se întâmplă acest lucru, se produce o singură celulă, parțial diploidă pentru genele transduse - fenomen numit *transducție avortată.* Dacă ADN-ul bacterian se recombină cu regiunea omologă a cromozomului bacterian, are loc *transducția completă ,* în care genele transduse devin o parte permanentă a cromozomului, care este transmisă tuturor celulelor fiice.

Atât transducția avortată, cât și cea completă sunt subclase ale unei categorii mai largi numită *transducție generalizată, care* se

caracterizează prin natura aleatorie a fragmentelor de ADN și a genelor transduse. Fiecare fragment al cromozomului bacterian are o probabilitate finită, dar mică, de a fi încapsulat în capul fagului și ulterior de a se recombina în timpul transducției. Majoritatea cazurilor de transducție generalizată sunt de tip avortat; unele date sugerează că transducția completă are loc de 10 până la 20 de ori mai puțin frecvent. Spre deosebire de transducția generalizată, *transducția specializată* are loc atunci când transferul de ADN bacterian nu este aleatoriu, ci sunt transduse doar gene specifice tulpinii. Acest lucru se întâmplă atunci când ADN-ul care reprezintă un bacteriofag atenuat se desprinde de cromozomul gazdă, purtând ADN bacterian la ambele capete.

Transducție și hărți

Ca și în cazul transformării, transducția a fost utilizată pentru studii de linkage și cartografierea cromozomilor bacterieni . Fragmentul de ADN bacterian implicat în transducție poate fi suficient de mare pentru a include numeroase gene. Prin urmare, două gene care sunt apropiate una de alta pe cromozomul bacterian (adică legate) pot fi transduse simultan, un proces numit cotransducție. Dacă două gene nu sunt suficient de apropiate pe cromozom pentru a fi incluse în același fragment de ADN, trebuie să aibă loc două evenimente de transducție independente pentru ca acele două gene să fie transduse în aceeași celulă. Deoarece acest lucru se întâmplă mult mai rar decât cotransducția, linkage-ul poate fi determinat prin compararea frecvenței recombinărilor simultane specifice.

Concentrându-se pe două sau trei gene legate, studiile de transducție pot determina și ordinea precisă a acestor gene. Cu cât genele sunt mai strâns legate, cu atât frecvența de cotransducție este mai mare. Studiile de cartografiere pot fi efectuate pentru trei gene strâns legate folosind același tip de raționament utilizat în alte tehnici de cartografiere.

6.8 Bacteriofagii suferă recombinare intergenică

În 1947, mai multe grupuri de cercetare au demonstrat că recombinarea între bacteriofagi poate fi detectată. Acest lucru a condus la descoperirea faptului că maparea genelor poate fi efectuată pe aceste virusuri. Astfel de studii s-au bazat pe descoperirea a numeroase mutații la nivelul fagilor , care puteau fi vizualizate sau analizate. Ca și în cazul bacteriilor și eucariotelor , aceste mutații permit identificarea genelor și urmărirea acestora în experimentele de mapare . Înainte de a lua în considerare recombinarea și maparea la aceste virusuri bacteriene, vom prezenta pe scurt câteva dintre mutațiile care au fost studiate.

Mutații ale bacteriofagului

Mutațiile fagilor afectează adesea morfologia plăcilor care se formează după liza celulelor bacteriene. De exemplu, în 1946 , Alfred Hershey a observat plăci T2 anormale pe plăci care conțineau tulpina B de *E. coli. În timp ce* plăcile T2 normale sunt mici și au un centru clar înconjurat de un halou difuz (aproape invizibil) , plăcile anormale erau mai mari și aveau un perimetru exterior mai definit (comparați plăcile mai clare din Figura 6.18). Când virusurile au fost izolate din aceste plăci și subcultivate în celule de *E. coli* B, aspectul zonelor chele era identic. Prin urmare, fenotipul zonei chele era o trăsătură ereditară rezultată din reproducerea fagilor mutanți . Hershey a numit fagul mutantul cu liză rapidă *(* r), deoarece credea că dimensiunea mai mare a zonelor chele se datora faptului că fagul are un ciclu de viață mai rapid sau mai eficient. Acum știm că fagii de tip sălbatic experimentează inhibarea reproducerii lor odată ce s-a format o zonă chelă de o anumită dimensiune. Mutantul r al fagilor T2 este capabil să depășească această inhibiție , producând zone chele mai mari .

Salvador Luria a descoperit o altă mutație a bacteriofagului , *gama gazdei* (h). Această mutație extinde gama de gazde bacteriene pe care fagul le poate infecta. Deși fagii T2 de tip sălbatic pot infecta

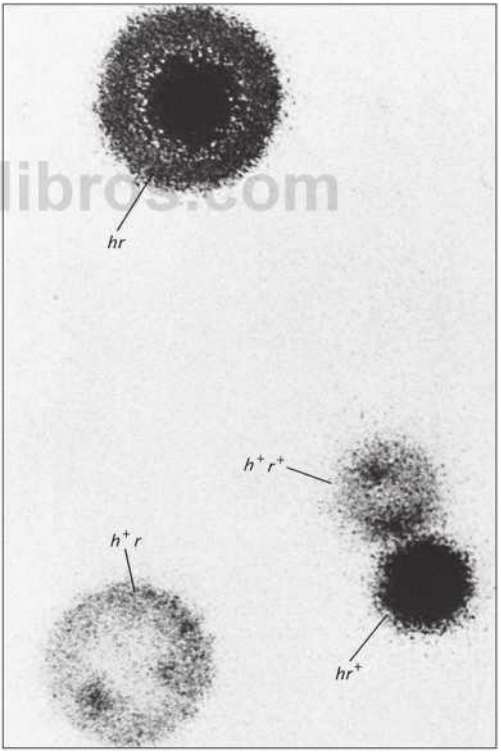


FIGURA 6.18 Fenotipuri de chelie observate după infecția simultană cu *E. coli* de două tulpini de fag T2, *h' r* și *hr'* . Pe lângă genotipurile paterne , sunt prezentate și *hr* și *h r* cheli recombinante .

E. coli B (o tulpină specifică) nu se poate asocia în mod normal cu sau adsorbi pe suprafața *E. coli* B-2 (o tulpină diferită). Cu toate acestea, mutația *h* conferă capacitatea de a se adsorbi și ulterior de a infecta *E. coli* B-2. Atunci când este cultivată într-o cultură mixtă de *E. coli* B și B-2, pata cheală *h* are un centru care pare mult mai închis la culoare decât cel al patei cheale h^+ (Figura 6.18).

Tabelul 6.1 enumeră alte tipuri de mutații care au fost izolate în studiile seriei de bacteriofagi cu perechi T (de exemplu, T2, T4, T6). Aceste mutații sunt importante în studiul fenomenelor genetice la bacteriofagi .

Unele tipuri mutante de fagi cu perechi T

Nume	Descriere
TABLA 6.1 *Mici.*	Mici zone cu chelie.
Tulburat.	Formează pete tulburi în *E. coli.* B.
de stea	, de formă neregulată.
Sensibilitate la UV:	Modifică sensibilitatea la lumina UV.
Formează plăci pe agarul cu acriflavină. Rezistă diluției rapide în apă distilată.	
Nu produce lizozim.	
Crește în *E. coli* K12, dar nu în B.	
Resistente a la acri flavi na	Crește la 25 °C, dar nu la 42 °C.
Choque osmótico	
Lisorima	
Ámbar	
Sensible a la temperatura	

Hărți ale bacteriofagelor

Recombinarea genetică în bacteriofagi a fost descoperită în experimente cu infecții mixte, în care aceeași cultură bacteriană a fost infectată *simultan cu două tulpini mutante diferite. Aceste studii au fost concepute astfel* încât numărul de particule virale să depășească cu mult numărul de celule bacteriene pentru a asigura infectarea simultană a majorității celulelor de către cele două tulpini virale. Dacă sunt implicate două loci , recombinarea se numește intergenică.

De exemplu, într-un studiu care a utilizat sistemul *T2IE. coli,* virusurile parentale au fost fie de genotip $h^+ r$ (gamă gazdă de tip sălbatic, liză rapidă), fie *hr' (* gamă gazdă extinsă , liză normală). Dacă nu s-ar produce nicio recombinare , aceste două genotipuri parentale ar fi singurii descendenți fagi așteptați. Cu toate acestea , pe lângă genotipurile parentale, au fost detectați și recombinanții h $^+$r $^+$ și *hr (a se vedea* Figura 6.18). La fel ca la eucariote, procentul de pete chelite recombinante împărțit la numărul total de pete chelite reflectă distanța relativă dintre gene.

Frecvența recombinare = *(oră* + oră)/numărul total de zone cu chelie X 100

Tabelul 6.2 prezintă date eșantion pentru loci *h* și *r*:

TABELUL 6.2 1 Rezultatele unei încrucișări care implică genele 1 *h* și *r* în fagul T2 (Ar $^+$ X * * r)

Genotip	Chelie	Desemnare
oră $^+$		
oră * *r*	42 i 76	ĺ % dintre descendenții paterni

Sursa: date de la Hershey și Rotman, 1949 .

Studii similare de recombinare au fost efectuate cu un număr mare de gene mutante într- o serie de bacteriofagi. Datele sunt

*h*r**	24% recombinante
oră	12

analizate într- un mod foarte similar cu cel utilizat în experimentele de cartografiere la eucariote. Polenizarea încrucișată pentru hărți în două și trei puncte este posibilă , iar procentul de recombinanți din numărul total de fagi urmași este calculat . Această valoare este - proporțională cu distanța relativă dintre două gene de pe molecula de ADN care constituie cromozomul .

Cercetările privind recombinarea la fagi susțin un model similar cu cel al crossing-over-ului la eucariote, un proces de rupere și reunificare între cromozomii virali. A fost determinată o schemă destul de clară a dinamicii recombinării virale. După faza de infecție timpurie, cromozomii fagilor încep să se replice. Pe măsură ce această fază progresează, un set de cromozomi se acumulează în citoplasma bacteriană. Dacă a avut loc o dublă infecție cu fagi de două genotipuri diferite , atunci setul de cromozomi va fi format inițial din cele două tipuri parentale. Schimbul genetic dintre aceste două tipuri va avea loc înainte, în timpul și după replicare, rezultând cromozomi recombinanți .

În exemplul pe care l-am analizat aici, pentru Vr *și* hr *′* , se produc cromozomii recombinanți h'r* și *hr* . Fiecare dintre acești cromozomi poate suferi replicare , iar cromozomii replicați pot face schimb între ei și cu cromozomii parentali. În plus, recombinarea nu se limitează la schimbul între doi cromozomi - trei sau mai mulți pot fi implicați simultan. Pe măsură ce dezvoltarea fagilor progresează, cromozomii sunt eliminați aleatoriu din set și ambalați în capul fagului , formând fagi maturi. Astfel, o varietate de genotipuri parentale și recombinante sunt reprezentate în urmașii fagilor .

După cum vom vedea în secțiunea următoare, sistemele de selecție foarte puternice au făcut posibilă detectarea recombinării - *intragenice* la virusuri, în care schimbul are loc în puncte din cadrul unei singure gene, spre deosebire de recombinarea intergenică , în care schimburile au loc între gene . Astfel de studii au condus la ceea ce a fost numită analiza structurii fine a genelor .

1 liră sterlină

Recombinarea intragenică are loc în fagul T4

Încheiem acest capitol explicând un exemplu ingenios de analiză genetică. La începutul anilor 1950, Seymour Benzer a întreprins o examinare detaliată a unui locus, *rii,* al fagului T4. Benzer a conceput cu succes experimente pentru a recupera recombinantele extrem de rare care apar ca urmare a schimbului intragenic. O astfel de recombinare este echivalentă cu încrucișarea la eucariote, dar în acest caz, în cadrul unei gene, mai degrabă decât într-un punct dintre două gene. Benzer a demonstrat că o astfel de recombinare are loc între ADN-ul bacteriofagilor individuali în timpul infecției simultane cu bacteria gazdă *E. coli.*

Rezultatul final al muncii lui Benzer a fost o hartă detaliată a locusului *rii* . Datorită informațiilor extrem de detaliate furnizate de analiza sa și având în vedere că aceste experimente au fost efectuate cu zeci de ani înainte de dezvoltarea tehnicilor de secvențiere a ADN-ului , datele pe care le-a obținut despre structura internă a genei au fost de o importanță enormă.

Locusul r/Z al fagului T4

Prima cerință în analiza genetică este izolarea unui număr mare de mutații ale genei care urmează a fi investigată. Mutanții locusului *rii* dau naștere la diferite zone cu chelie atunci când infectează tulpina B de *E. coli,* permițând identificarea lor ușoară. Figura 6.18 ilustrează zonele cu chelie mutante *r în comparație cu zonele cu chelie r* $^{+}$ de tip sălbatic din fagii T2 înrudiți. Tehnica lui Benzer a constat în izolarea multor mutanți *rii* independenți - în cele din urmă a obținut aproximativ 20.000 - și efectuarea de studii de recombinare pentru a obține o hartă a acestui locus. Benzer a presupus că majoritatea acestor mutații, deoarece au fost izolate - aleatoriu, au reprezentat locații diferite în cadrul locusului rii și ar oferi astfel o bază largă pentru studiile de cartografiere .

Cheia analizei lui Benzer a fost că fagii mutanți rii , deși capabili să infecteze și să lizeze *E. coli* B, nu au putut liza cu succes o a doua tulpină înrudită, *E. coli* K12(X) **. Cu toate acestea, fagii de tip sălbatic au putut liza atât tulpina B, cât și K12 . Benzer a argumentat că aceste condiții ofereau potențialul pentru un sistem analitic extrem de sensibil. Dacă fagii din oricare două tulpini mutante diferite infectau simultan *E. coli* B, schimburile dintre cele două situsuri mutate din cadrul locusului ar duce la recombinante rare de tip sălbatic (Figura 6.19). Dacă populația de fagi descendenți care conține mai mult de 99,9% fagi *rii* și mai puțin de 0,1% fagi de tip sălbatic ar fi apoi utilizată pentru a infecta tulpina K12, numai acele recombinante de tip sălbatic s-ar putea reproduce cu succes și ar da naștere la pete de chelie de tip sălbatic . *Acesta este punctul* esențial pentru *recuperarea și cuantificarea recombinantelor foarte rare* .

Folosind tehnici de diluție serială, Benzer a reușit să determine numărul total de fagi mutanți *rii* produși în *E. coli* B și numărul total de fagi recombinanți de tip sălbatic care lizează *E. coli* K12. Aceste date oferă baza pentru calcularea frecvenței de recombinare, o valoare proporțională cu distanța din cadrul genei dintre cele două mutații studiate. După cum vom vedea, acest design experimental a fost extraordinar de sensibil. Este demn de remarcat faptul că Benzer a reușit să detecteze un singur fag recombinant de tip sălbatic printre 100 de milioane de fagi mutanți . Atunci când informațiile din multe astfel de experimente sunt combinate, este posibil să se obțină o hartă detaliată a locusului.

Înainte de a studia această tehnică, trebuie să descriem o descoperire importantă făcută de Benzer în primele etape ale acestei analize - o descoperire care a dus la dezvoltarea unei tehnici utilizate pe scară largă .

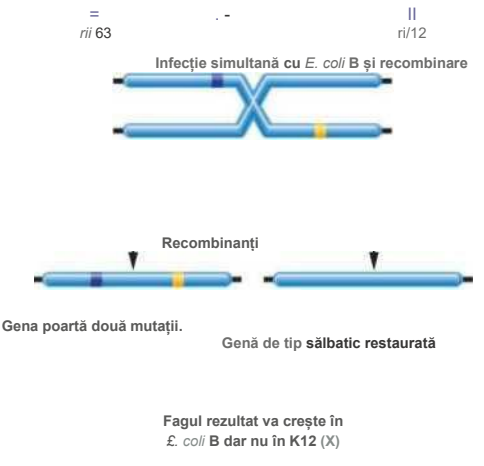


FIGURA 6.19 Ilustrarea recombinării intragenice între două mutații ale locusului *rii* al fagului T4. Rezultatul este producerea unui fag de tip sălbatic care va crește atât în E. *coli* B, cât și în K12 , și a unui alt fag care va încorpora ambele mutații la locusul rii . Acest ultim fag va crește în *E. coli* B, dar nu în K12.

FIGURA 6.22 Demonstrație că recombinarea dintre un cromozom fagic cu o deleție în cistronul A și un altul cu o mutație punctuală care se suprapune peste deleție nu poate duce la un cromozom cu cistroni A și B de tip sălbatic.

FIGURA 6.24 Hartă parțială a mutațiilor în cistronii *A și B ai* locusului T4 al fagului *rii* . *Fiecare pătrat reprezintă* o mutație independentă, izolată. Observați cele două zone în care este detectat cel mai mare număr de mutații, care sunt numite „puncte fierbinți" *(A6cd și B5).*

În laboratoarele de genetică de astăzi , testul de complementare, despre care am discutat în Capitolul 4.

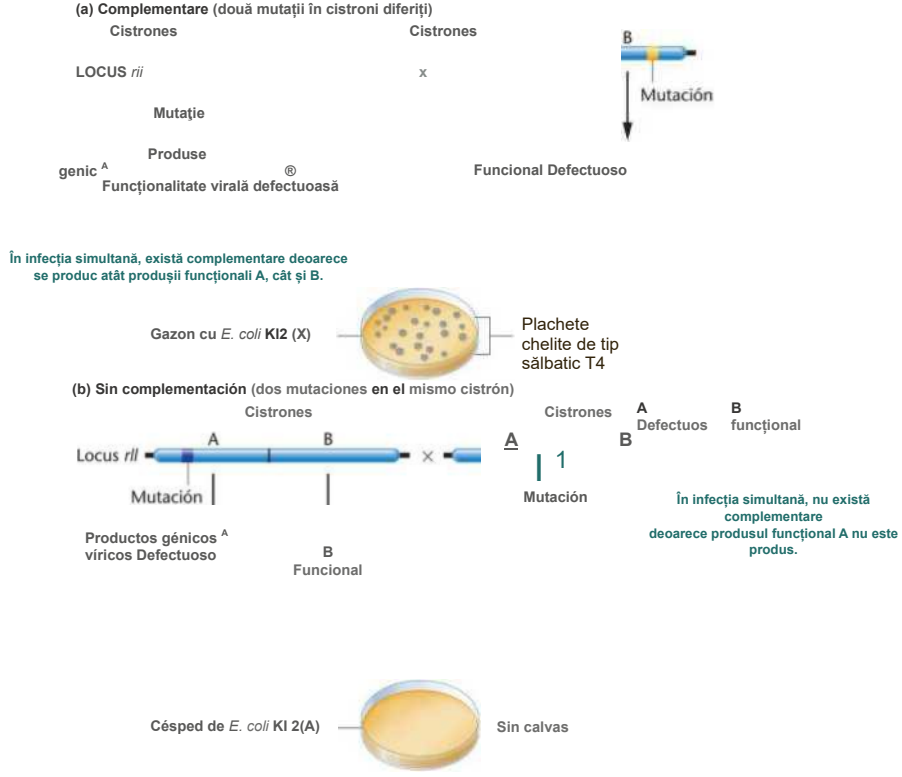
Complementare prin mutații *rII*

Înainte ca Benzer să poată începe aceste studii de recombinare intragenică , a trebuit să rezolve o problemă pe care a întâmpinat-o în primele etape ale experimentelor sale. Atunci când a efectuat un control în experimentul său, în care a infectat simultan bacteria K12 cu perechi de *tulpini mutante rii diferite,* Benzer a constatat ocazional că anumite perechi de tulpini mutante *rii* se lizează.

bacterii K12 .

La început, acest lucru a fost foarte surprinzător, deoarece se presupunea că doar *fagii* rii de tip sălbatic erau capabili să lizeze bacteriile K12 . Cum ar putea două tulpini *rii mutante să prezinte* funcție de tip sălbatic dacă, așa cum se credea, fiecare dintre ele avea un defect în aceeași genă ?

Benzer a argumentat că, în timpul infecției simultane, fiecare tulpină mutantă îi furniza celeilalte ceva ce îi lipsea, restabilind astfel funcția de tip sălbatic. Acest fenomen , pe care l- a numit complementare, este ilustrat în Figura 6.20 (a). Când au fost testate mai multe perechi de mutații, fiecare mutație a aparținut unuia dintre cele două grupuri de complementare posibile , A sau B. Cele care nu se completau reciproc au fost plasate în același grup de



Complementare. În timp ce cele care se completau reciproc erau atribuite unor grupuri de complementare diferite. Benzer a inventat termenul de cistron, pe care l-a definit ca fiind cea mai mică unitate genetică funcțională, pentru a descrie astfel de grupuri de complementare . În terminologia actuală, știm că un cistron reprezintă o genă.

Acum știm că cistronii Benzer A și B reprezintă de fapt două gene distincte la ceea ce am numit inițial locusul *rii* (datorită presupunerii inițiale că era o singură genă). Complementarea are loc atunci când o bacterie K12 este infectată cu doi *mutanți rii,* dintre care unul are o mutație în gena A, iar celălalt în gena B. Astfel, există o sursă pentru ambele produse genetice de tip sălbatic, deoarece mutantul A furnizează produsul de tip sălbatic B , iar mutantul B furnizează produsul de tip sălbatic A. De asemenea, putem explica de ce două tulpini necomplementare, adică doi mutanți ai cistronului A, sunt de fapt mutații în aceeași genă. În acest caz, dacă doi mutanți ai cistronului A sunt combinați, va exista imediat o sursă de produs de tip sălbatic B , dar nu și de produs de tip sălbatic A [Figura 6.20(b)].

Odată ce Benzer a reușit să plaseze toate mutațiile rll *fie* în cistronul A, fie în cistronul B, a putut reveni la studiile sale despre recombinarea intragenică, comparând mutațiile cistronului A între ele și același lucru pentru cistronul B.

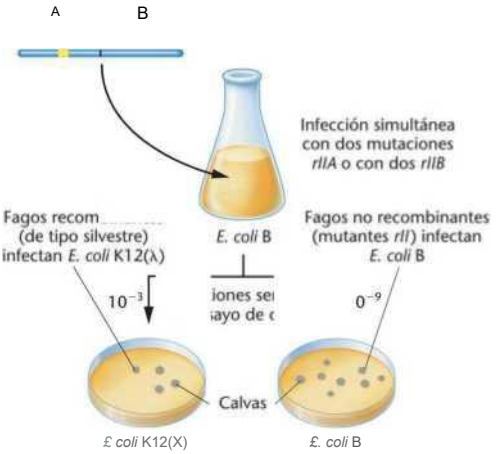
De exemplu, dacă doi mutanți r/ZA (adică două tulpini de fagi cu mutații distincte în cistronul A) sunt lăsați să infecteze *E. coli* B într-o cultură lichidă și dacă are loc recombinarea între situsurile mutaționale din cistronul A, atunci se va produce descendență virală de tip sălbatic, deși la o frecvență scăzută. Dacă probele de virusuri obținute printr-un astfel de experiment sunt apoi placate pe E. *coli* K12, numai recombinanții de tip sălbatic vor prelua bacteria și vor forma pete de chelie. Numărul total de virusuri descendente nerecombinante a fost, de asemenea, determinat prin placarea unei probe pe E. *coli* B.

Acest protocol experimental este ilustrat în Figura 6.21. Procentul de recombinări poate fi determinat prin numărarea petelor

$$2\left(\frac{4 \times 10^{3}}{8 \times 10^{9}}\right)$$

goale la diluția corespunzătoare în fiecare caz. Ca și în experimentele de cartografiere la eucariote, frecvența de recombinare este o estimare a distanței dintre cele două mutații din cistron. De exemplu, dacă numărul de recombinări este de 4 × 10^9/mL și numărul total de urmași este de 8 × 10^9 / mL, atunci - frecvența de recombinare dintre cei doi mutanți este:

$$= 2(0{,}5 \times 10^{-6})$$
$$= 10^{-6}$$
$$= 0{,}000001$$


A
B
Infección simultánea con dos mutaciones rIIA o con dos rIIB
Fagos recom (de tipo silvestre) infectan E. coli K12(λ)
E. coli B
Fagos no recombinantes (mutantes rII) infectan E. coli B
10⁻³
0⁻⁹
Calvas
£ coli K12(X)
£. coli B
Esta placa permite determinar el número de recombinantes: 4 x 10' fagos recombinantes/mL
Esta placa permite determinar el número total de fagos por mL: 8 x 10' fagos rII/mL

mutațiile din cadrul fiecăruia.

ACUM REZOLVĂ ASTA

6.3 Într-un studiu de complementare la locusul *rII* al fagului T4, au fost testate trei grupuri diferite de mutații . Pentru fiecare grup, au fost testate doar două combinații. Pe baza fiecăruia dintre seturile de date prezentate mai jos, preziceți rezultatele celui de-al treilea experiment pentru fiecare grup.

Grupo A	Grupo B	Grupo C
d X e-lisis *d* X *f-no* lisis e X f-¿?	*g* X *b-no* lisis *g* X *i-no* lisis *b* X *i-¿?*	*j* x fc-lisis *j* X /-lisis * X /-¿?

■ **SUGERENCIA:** *este problema requiere comprender por qué se produce la complementación de una infección simultánea de una célula bacteriana por dos cepas distintas de bacteriófagos, cada una con una mutación diferente dentro del locus rii. La dove para solventar el problema es ser consciente de que si cada mutación modifica un producto genico distinto, entonces cada cepa proporcionará el producto del que carece la otra, dando lugar asía la complementación.*

Analiza recombinării

Dintre cele aproximativ 20.000 *de mutații rii, aproximativ jumătate aparțineau* fiecărui cistron . Benzer s-a pregătit să cartografieze

Este necesar să se înmulțească cu 2 deoarece fiecare recombinare dă naștere la doi produși reciproci. Doar unul dintre ei, tipul sălbatic, este detectat.

Test pentru deleții ale locusului *rii*

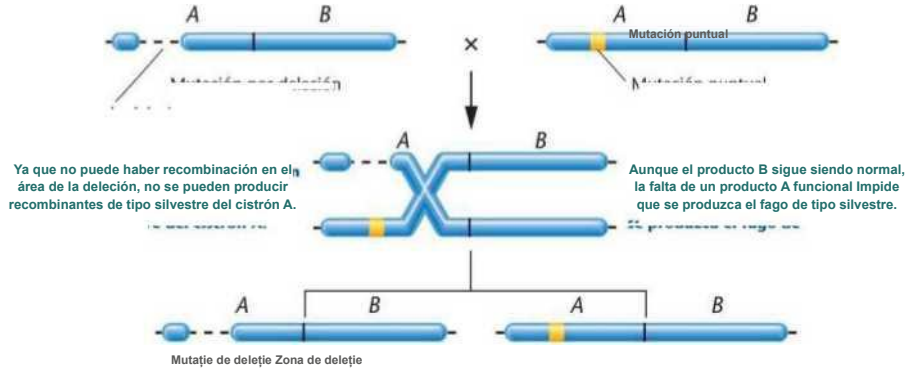
Deși sistemul selectiv descris mai sus a permis maparea mutațiilor în cadrul fiecărui cistron, testarea a 1.000 de mutanți, câte doi în același timp, în toate combinațiile, ar fi necesitat milioane de experimente. Din fericire, Benzer a reușit să ocolească acest obstacol atunci când a conceput o abordare analitică numită analiză prin deleție. El a descoperit că unele dintre mutațiile *rii* erau de fapt deleții ale unor fragmente mici în cadrul fiecărui cistron. Adică, modificările genetice care au dat naștere particularităților *rii* nu erau o caracteristică a mutațiilor punctuale. Cel mai important, atunci când o mutație prin deleție a fost testată în infecția simultană cu o mutație punctuală localizată în porțiunea deletă a aceluiași cistron, aceasta nu a produs niciodată recombinante de tip sălbatic. Motivul acestei incapacități este ilustrat în Figura 6.22. Deoarece zona deletă nu are ADN-ul care conține mutația punctuală, recombinarea nu este posibilă . Astfel, a fost disponibilă o metodă care a permis localizarea aproximativă, dar rapidă, a oricărei mutații, cu condiția ca aceasta să se afle într-o regiune acoperită de o deleție.

Prin urmare, analiza delețiilor a fost utilizată pentru localizarea inițială a fiecărei mutații. De exemplu, așa cum se arată în Figura 6.23, șapte deleții suprapuse, care se întind pe mai multe regiuni ale cistronului A, au fost utilizate pentru clasificarea inițială a mutațiilor punctuale din cistronul respectiv. În funcție de dacă cromozomul viral cu o mutație punctuală și un cromozom cu o deleție se recombină , fiecare mutație punctuală ar putea fi atribuită unei zone specifice a fiecărui cistron. Alte deleții din fiecare dintre cele șapte zone pot fi apoi utilizate pentru a localiza sau cartografia mai precis fiecare mutație punctuală . Reamintim că, în fiecare caz, fiecare mutație punctuală *este* localizată în zona unei deleții atunci când nu are ca rezultat nicio recombinare de tip sălbatic .

genei *rII*

După mai mulți ani de muncă , Benzer a obținut o hartă genetică a celor doi cistroni care alcătuiesc locusul *rii* . al fagului T4 (Figura 6.24). Dintre cele 20.000 de mutații analizate, au fost cartografiate pozițiile relative a 307 situsuri distincte din cadrul acestui locus . Zonele cu multe mutații au fost denumite puncte fierbinți, care au fost aparent mai susceptibile la mutații decât zonele cu una singură sau foarte puține mutații. În plus, Benzer a descoperit zone în cistroni unde nu s-au găsit mutații. Din studiile sale , el a estimat că nu au putut fi localizate până la 200 de unități de recombinare .

Importanța lucrării lui Benzer constă în aplicarea sa la analiza genetică a ceea ce anterior fusese considerat o unitate abstractă: gena . În 1955, Benzer a demonstrat că o genă nu este o particulă indivizibilă , ci constă mai degrabă din unități de mutație și recombinare aranjate într -o ordine specifică. Acum știm că aceste unități sunt nucleotidele care alcătuiesc ADN-ul. Analiza sa , efectuată înainte de studiile moleculare detaliate ale genei din anii 1960, este considerată unul dintre exemplele clasice de experimentare în genetică.


A
B
×
A
B
Mutación puntual
A
B
Ya que no puede haber recombinación en el área de la deleción, no se pueden producir recombinantes de tipo silvestre del cistrón A.
Aunque el producto B sigue siendo normal, la falta de un producto A funcional impide que se produzca el fago de tipo silvestre.
A
B
A
B
Mutație de deleție Zona de deleție

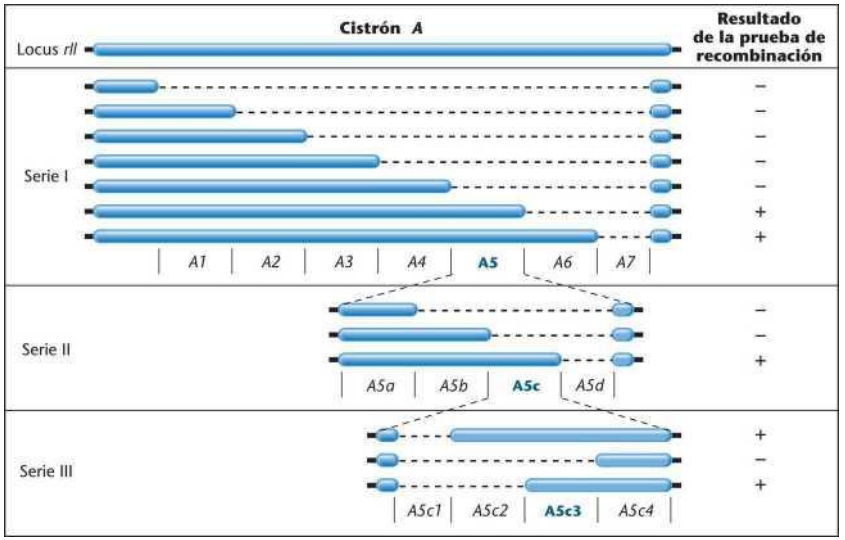
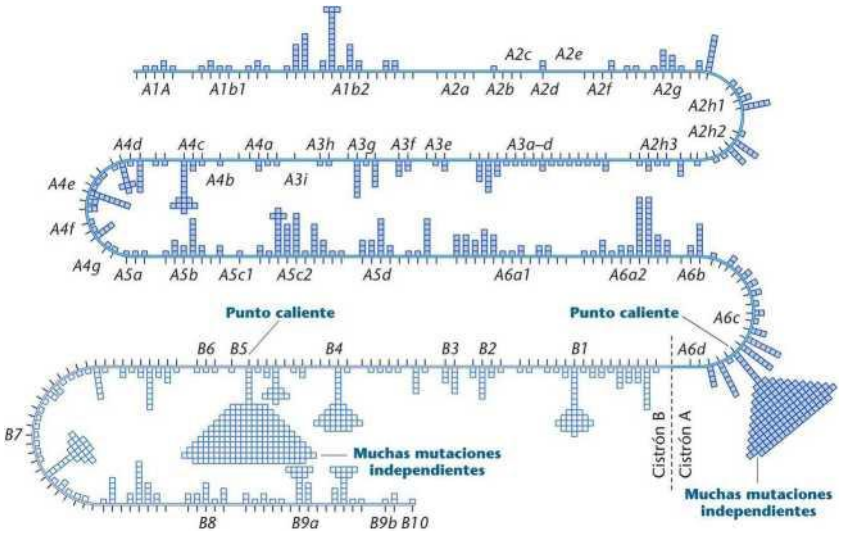


FIGURA 6.23 Trei serii de deleții suprapuse în cistronul A al *locusului rii,* utilizate pentru a localiza poziția unei mutații *rii* necunoscute . De exemplu, dacă o tulpină mutantă cu fiecare deleție (zone punctate) din Seria I este testată pentru producerea de urmași recombinanți de tip sălbatic și se obțin rezultatele prezentate în dreapta (+ sau —), mutația trebuie să fie în segmentul A5 . În Seria II, mutația este localizată într-un segment mai mic, A5c , iar în Seria III în segmentul *ASc3.*



De la genele holerei la vaccinurile comestibile

SAU gamă tot mai largă de instrumente de genetică moleculară, oamenii de știință abordează unele dintre cele mai grave boli bacteriene care afectează propria noastră specie . Capacitatea noastră de a clona gene bacteriene și de a le transfera altor organisme permite în mod direct dezvoltarea unor noi tratamente promițătoare . Povestea vaccinurilor comestibile pentru tratarea holerei ilustrează modul în care ingineria genetică este aplicată pentru controlul unei boli umane grave .

Holera este cauzată de Vibrio *cholerae,* O bacterie curbată, în formă de tijă, care se găsește în râuri și oceane . Multe tulpini genetice de *V. cholerae* sunt inofensive; doar câteva sunt patogene. Infecția apare atunci când o persoană bea apă sau mănâncă alimente contaminate cu V. *cholerae* . agent patogen. Când aceste bacterii ajung în sistemul digestiv , ele colonizează intestinul subțire și produc proteine numite enterotoxine , care invadează celulele mucoase care căptușesc intestinul. Aceasta provoacă o secreție masivă de apă și săruri dizolvate din aceste celule, rezultând diaree severă , deshidratare severă , crampe musculare, letargie și adesea moarte . Enterotoxina este formată din două polipeptide, numite subunități A și B, codificate de două gene diferite.

Holera rămâne principala cauză de deces în țările în curs de dezvoltare, unde salubritatea de bază lipsește , iar aprovizionarea cu apă este adesea contaminată . De exemplu , în iulie 1994 , au existat 70.000 de cazuri de holeră în rândul rwandezilor care se înghesuiau în taberele de refugiați din Goma, Zair, rezultând în 12.000 de decese. După o absență de aproape 100 de ani, holera a reapărut în America Latină în 1991, răspândindu-se din Peru în Mexic și provocând peste 10.000 de vieți. În urma cutremurelor din Haiti din 2010 , o epidemie severă de holeră a cuprins țara , ucigând peste 4.000 de oameni.

O nouă tehnologie genetică este în curs de dezvoltare pentru combaterea holerei. Această tehnologie se concentrează pe plante modificate genetic care acționează ca vaccinuri. Oamenii de știință introduc o genă clonată - cum ar fi una care codifică o proteină bacteriană - în genomul unei plante. Planta transgenică produce noua genă, iar imunitatea se dobândește atunci când un animal mănâncă planta. Gena plantei acționează ca un antigen , stimulând producția de anticorpi pentru a proteja împotriva infecției bacteriene sau a efectelor toxinelor acesteia. Deoarece subunitatea B a enterotoxinei holerice se leagă de celulele intestinale, cercetările s - au concentrat pe utilizarea acestei polipeptide ca antigen, în speranța că anticorpii împotriva acesteia vor împiedica legarea toxinei la intestin, făcând bacteria inofensivă .

Charles Arntzen și asociații săi de la Universitatea Cornell conduc eforturile de dezvoltare a unui vaccin comestibil . Pentru a testa sistemul, aceștia folosesc subunitatea B a unei enterotoxine din E. coli . care este similară ca structură și proprietăți imunologice cu proteina holerei . Primul pas a implicat obținerea unei - clone ADN a genei care codifică subunitatea B și atașarea acesteia la un promotor care ar induce transcripția sa în toate țesuturile vegetale . În al doilea rând, cercetătorii au introdus gena hibridă în plante de cartof prin transformare cu *Agrobacterium.* Plantele transgenice și-au exprimat noua genă și au produs subunitatea B a enterotoxinei . Al treilea pas a implicat hrănirea - șoarecilor cu câteva grame din acești tuberculi modificați genetic. Echipa lui Arntzen a descoperit că șoarecii au produs anticorpi specifici împotriva subunității B și i-au secretat în intestinul subțire. Când șoarecii au fost hrăniți ulterior cu - enterotoxină purificată , aceștia au fost protejați împotriva efectelor acesteia și nu au dezvoltat - simptome de holeră. În studiile clinice efectuate pe oameni în 1998, aproape toți voluntarii au dezvoltat un răspuns imun și niciunul nu a prezentat efecte secundare adverse .

Experimentele lui Arntzen au servit drept model pentru alte cercetări legate de vaccinurile comestibile. În prezent, oamenii de știință dezvoltă vaccinuri comestibile împotriva bolilor bacteriene precum antraxul și tetanosul, precum și împotriva bolilor virale precum rabia, SIDA și rujeola.

Rândul tău

I. Acordați - vă timp, individual sau în grupuri, pentru a răspunde la următoarele întrebări . Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a înțelege mai bine unele dintre problemele legate de - dezvoltarea și utilizarea vaccinurilor comestibile .

1. Care sunt cele mai recente evoluții în - cercetarea vaccinurilor comestibile împotriva holerei ?

O sursă de informații este site-ul PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db — PubMed), așa cum este descris în secțiunea „Explorarea genomicii" din Capitolul 2.

2. În prezent, sunt disponibile mai multe - vaccinuri orale împotriva holerei . Având în vedere disponibilitatea

acestor vaccinuri, de ce credeți că oamenii de știință continuă să dezvolte - mai multe vaccinuri comestibile împotriva holerei? Ce tip de vaccin ați alege pentru a vaccina populațiile expuse riscului de a contracta holeră?

Citiți despre aceste vaccinuri împotriva holerei pe site-ul Organizației Mondiale a Sănătății la următoarea adresă hctp: //www.who.int/topics/cholera/vaccines/current/en /index.html

3. Holera se răspândește prin ingerarea de apă și alimente contaminate. În ciuda severității acestei boli, pacienții cu holeră pot fi tratați eficient prin rehidratare orală. Holera devine o problemă gravă de sănătate publică doar atunci când tratamentele medicale și sanitare adecvate nu sunt disponibile. Având în vedere aceste circumstanțe, câți bani credeți că ar trebui să investim în cercetare pentru dezvoltarea de vaccinuri împotriva holerei, comparativ cu banii investiți în îmbunătățirea sistemelor de salubritate, a sistemelor de tratare a apei și în creșterea educației cu privire la aceste tratamente?

Puteți găsi o discuție despre tratamentele și metodele de prevenire a holerei în http://ro.wikipedia.org/wiki/Holeră

4. Una dintre problemele asociate cu vaccinurile comestibile este îngrijorarea existentă în opinia publică cu privire la organismele modificate genetic (OMG). Atitudinile variază de la opoziția directă față de OMG-uri din motive morale , până la îngrijorări cu privire la potențialele - pericole pentru mediu asociate cu cultivarea plantelor modificate genetic . Care este opinia dumneavoastră despre utilizarea OMG -urilor ? Care credeți că sunt cele mai puternice argumente pro și contra lor? De ce ?

Oamenii de știință dezbat și ei aceste probleme. O astfel de dezbatere este cea prezentată în articolul lui Arntzen, CJ și colab., 2003, „Modificări genetice ale culturilor: știință, politică și comunicare”, Nature Rev Genet 4: 839-843.

SAU STUDIU DE CAZ A trata sau a nu trata

Un bebeluș de patru luni prezintă simptome ușoare de febră de 36 de ore, iar mama sa, anxioasă, decide să sune medicul pediatru. Examinările și testele nu relevă semne externe de infecție sau cauza febrei . Mama anxioasă îl întreabă pe medicul pediatru despre utilizarea antibioticelor, dar acesta recomandă observarea atentă a bebelușului timp de câteva zile înainte de a lua o decizie . Medicul explică faptul că decenii de utilizare necontrolată a antibioticelor în medicină și agricultură au dus la o creștere la nivel mondial a numărului de bacterii care sunt acum rezistente la aceste medicamente. De asemenea, el spune că - comportamentul reproductiv al bacteriilor le permite să schimbe trăsături de rezistență la antibiotice cu o gamă largă de alte bacterii care cauzează boli și că există acum multe tulpini rezistente la mai multe antibiotice. Informațiile furnizate de medic ridică mai multe întrebări interesante.

1. dreptate doctorul când spune că bacteriile pot partaja factori de rezistență?
2. Unde poartă bacteriile genele de rezistență la antibiotice și cum le schimbă ?
3. Dacă unui bebeluș i se administrează un antibiotic ca măsură de precauție , cum ar putea contribui acest lucru la dezvoltarea bacteriilor rezistente?
4. În afară de spitale , unde altundeva ar putea copiii să intre în contact cu tulpini de bacterii rezistente la antibiotice ? Prezența unor astfel de bacterii în organism indică întotdeauna o infecție?

resumen

1. Recombinarea genetică la bacterii poate avea loc în trei moduri: conjugare , transformare și transducție.
2. Conjugarea poate fi inițiată de o bacterie care adăpostește în citoplasmă o plasmidă numită factor F, ceea ce o transformă într-o celulă donatoare . După conjugare , celula receptoare primește o copie a factorului F și trece la starea F.
3. Când factorul F se integrează în cromozom din citoplasmă , celula rămâne donatoare și se numește celulă Hfr. După crossing over, cromozomul donator se mișcă unidirecțional spre receptor, inițiind recombinarea și oferind baza pentru cartografierea momentului cromozomului bacterian .
4. Plasmidele, cum ar fi factorul F , sunt molecule de ADN care se replică autonom și se găsesc în citoplasma bacteriană . Uneori, acestea conțin gene distinctive care conferă rezistență la antibiotice , împreună cu - genele necesare pentru transferul plasmidei în timpul conjugării .
5. Transformarea la bacterii, care nu necesită contact intercelulă, implică intervenția ADN-ului exogen care pătrunde într-o bacterie receptoare și se recombină cu cromozomul gazdă. Cartografierea legăturilor genelor strâns aliniate poate fi efectuată în timpul analizei transformării .
6. Bacteriofagii (virusurile care infectează bacteriile) au un ciclu biologic bine definit , în timpul căruia se reproduc în interiorul celulei gazdă și pot fi studiați folosind testul de chelie.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

fi litici, adică infectează celula gazdă, se reproduc și apoi o lizează ; sau invers, pot lizogeniza celula gazdă , caz în care o infectează și își integrează propriul ADN în cromozomul gazdă , dar nu se reproduc.

Transducția este recombinarea ADN-ului bacterian de către un virus . Când o bacterie lizogenizată intră ulterior în ciclul litic, noul bacteriofag servește drept vehicul pentru transferul de ADN (bacterian) de la gazdă. Au fost studiate diverse fenotipuri mutante la bacteriofagi, inclusiv mutații în morfologia plăcii și în gama gazdei. Aceste fenotipuri mutante au servit drept bază pentru cartografierea virusurilor corespunzătoare.

10. Transducția poate fi utilizată și pentru studii de linkage și cartografiere la bacterii .
11. Analiza genetică a locusului rii al bacteriofagului T4 i-a permis lui Seymour Benzer *să* studieze recombinarea intragenică. Prin izolarea mutanților *rii și efectuarea* de analize de complementare , studii de recombinare și cartografiere a delețiilor , Benzer a reușit să localizeze și să cartografieze peste 300 de situsuri distincte în cadrul celor doi cistroni ai locusului rii .

IDEI ȘI SOLUȚII

1. A fost creată o hartă temporală pentru o încrucișare care implică genele *his, leu, mal și xyl.* Celulele receptoare au fost auxotrofe pentru toate cele patru gene. După 25 de minute, încrucișarea a fost oprită, cu următoarele rezultate în celulele receptoare. Desenați o diagramă a pozițiilor acestor gene în raport cu originea (O) a factorului F și a celorlalte gene.

   (a) 90% au fost *xil**
   (b) 80% au fost *rele**
   (c) 20% au fost /lis*
   (d) niciunul nu a fost *leu**

   Soluție. Deoarece gena *xyl* a fost transferată cel mai frecvent , aceasta este cea mai apropiată de O (foarte aproape). Gena *mal* este următoarea cea mai apropiată și rezonabil de aproape de *xyl, urmată de* gena *his* . Gena *leu* este cea mai îndepărtată de aceste trei, deoarece niciun recombinant recuperat nu o conține. Diagrama ilustrează aceste poziții relative de-a lungul unui segment al cromozomului circular.

2. Într-un experiment de transformare, s-au utilizat trei tulpini bacteriene ca surse de ADN donator, fiecare cu una dintre mutațiile *a, b și e*. Celulele receptoare erau de tip sălbatic pentru aceste gene, dar exprimau mutația *d.*

   (a) Pe baza următoarelor date și presupunând că locația genei *d* precede genele *a, b și c,* propuneți o hartă a linkage-urilor pentru cele patru gene.

donator de ADN	Receptor	Transformatoare	Frecvența transformatorului
un d	<r<r		0,21
*b d' CD**	*băiat ed*	ăăă	0,18 0,63

   (b) Dacă ADN-ul donor ar fi de tip sălbatic , iar celulele receptoare ar fi *ab, a~c~* sau *b~c~,* ce încrucișări v-ați aștepta să producă cel mai mare număr de transformanți de tip sălbatic?

   Soluție, (a) Aceste date reflectă distanțele relative dintre fiecare dintre genele *a, b* și *c* și gena *d.* Genele a *și* b sunt aproximativ echidistante față de gena *d* și strâns *legate* . Gena c Este situată mai departe. Presupunând că gena *d* le precede pe celelalte, harta este următoarea:

   (b) Deoarece genele *a și b* sunt strâns legate, este mai probabil să fie cotransformate într-o anumită încrucișare. Prin urmare , celulele receptoare *a-b* sunt mai predispuse să se convertească la tipul sălbatic .

3, Analizând structura fină a locusului T4 al fagului *rii* , Benzer a putut efectua teste de complementare pentru orice pereche de mutații odată ce a fost sigur că locusul avea doi cistroni. El a verificat complementarea prin infectarea simultană *a E. coli.* K12 a fost expusă la două tulpini de fagi , fiecare cu o mutație diferită, niciuna dintre ele neputând liza K12 de una singură . Pe baza următoarelor date, determinați ce mutații se află în oricare dintre cistroni, presupunând că mutația 1 (M1) este în cistronul A și mutația 2 (M -2) este în cistronul B. Există cazuri în care mutația nu poate fi atribuită corect ?

Rezultate testate în perechi *	
1.2	+
1.3	
1.4	
1.3	+
2.3	
2.4	+
2.5	-

* **+ sau — indică finalizarea, respectiv eșecul finalizării.**

Soluție. M1 și M5 se completează reciproc și, prin urmare, nu se află în același cistron. Astfel, M5 trebuie să fie în cistronul B. M2 și M4 se completează reciproc. Folosind același raționament, M4 nu se află cu M2 și , în consecință , se află în cistronul A. M3 nu este complementar nici cu M1, nici cu M2 și, prin urmare, s -ar părea că se află în ambii cistroni . O explicație ar fi că baza fizică a lui M3 se suprapune cumva cu ambii

.

cistronii A și B. Ar putea fi o mutație dublă, cu o modificare a secvenței în fiecare cistron. Ar putea fi, de asemenea, o deleție care se suprapune cu ambii cistroni, făcând imposibilă complementarea cu M1 și M2.

4. O altă mutație, M-6, a fost confirmată, rezultatele fiind prezentate mai jos.

Pereche testată	Rezultate
1.6	+
2.6	—
3.6	—
4.6	+
5.6	-

Trageți toate concluziile posibile despre M-6.

Soluție. Aceste rezultate sunt în concordanță cu atribuirea M-6 cistronului B.

5. Apoi a fost efectuat un test de recombinare cu M-2, M-5 și M-6 pentru a cartografia cistronul B. Analiza recombinării utilizând atât *E. coli* B, cât și K12 a arătat că recombinarea a avut loc între M-2 și M-5 și între M-5 și M-6, dar nu între M-2 și M-6. De ce nu?

Soluție. M-2 și M-6 sunt fie mutații identice, fie una dintre ele poate fi o deleție care se suprapune cu cealaltă , dar nu cu M-5. În plus, datele nu exclud posibilitatea ca ambele să fie deleții.

6. În studiile de recombinare a locusului *rl1* al fagului T4 , care este - semnificația valorii determinate la calcularea creșterii fagilor în tulpina K12 în comparație cu tulpina B de *E. coli* ? după o infecție simultană cu *E. coli?* Care valoare este întotdeauna mai mare ?

Soluție. La efectuarea analizei cheliei la *E. coli* În celula B, unde atât fagii de tip sălbatic, cât și cei mutanți sunt Utic, se poate determina numărul total de fagi pe mililitru . Deoarece aproape toate celulele sunt mutanți *rii.* Pentru oricare dintre tipuri , această valoare este mult mai mare decât valoarea obținută cu K12. Pentru a evita contaminarea totală a plăcii, este necesară o diluție mare. Mutațiile *rii* nu vor crește în K12, dar fagii de tip sălbatic vor crește . Deoarece fagii de tip sălbatic sunt recombinanți rari, vor fi relativ mai puțini și va fi necesară o diluție mai mică .

li I P m □ c V nrPCFiint^c lo ¿-I icz“i icirAtn
riUUICllldb y UlCVUllldD Udi d Id UlbCUblCHI MG , 1 ° 1

Para ver los problemas y tutoriales asignados pot
r , 7 e> r
el profesor, consulte www.mastenngenetics.com

C.

CÓMO LO SABEMOS

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra sistemelor genetice prezente în bacterii și în virusurile care utilizează bacteriile ca gazde (bacteriofagi) . În special, am discutat mecanismele prin care bacteriile și fagii lor suferă recombinări genetice, mecanisme care permit geneticienilor să cartografieze cromozomii bacteriilor și bacteriofagilor. În acest proces, am avut numeroase ocazii să ne întrebăm cum au fost obținute toate aceste informații . Pe baza explicațiilor date în capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări?
   (a) De unde știm că există gene în bacterii și bacteriofagi?
   (b) De unde știm că bacteriile suferă recombinare genetică, permițând transferul de gene de la un organism la altul?
   (c) Cum știm dacă recombinarea genetică între bacterii implică contact celulă - celulă ?
   (d) De unde știm că bacteriofagii recombină materialul genetic prin transducție și că contactul celulă-celulă nu este esențial pentru ca transducția să aibă loc?
   (e) De unde știm că schimburile intergenice au loc în bacteriofagi ?
   (f) *De* unde știm că locusul rii din bacteriofagul T4 este subdivizat în două regiuni sau cistroni?
   (b) Cum s-a stabilit că transferul de cromozomi a fost unidirecțional?
   (c) Care este baza genetică pentru ca o bacterie să fie F*?
4. Enumerați principalele diferențe dintre (a) încrucișările bacteriene F + X F' și Hfr X F; și (b) bacteriile F', F, Hfr și F'.
5. Descrieți elementele de bază ale cartografierii cromozomiale în încrucișările Hfr X F' .
6. În general, atunci când se efectuează experimente de recombinare cu bacterii, bacteriile participante sunt amestecate într-un mediu complet și apoi transferate într-un mediu de creștere minimal . De ce să nu se utilizeze protocolul invers, utilizând mai întâi mediul minimal și apoi mediul complet?
7. într-o încrucișare Hfr XF aproape niciodată nu se produc recombinante F + ?
8. Descrieți originea bacteriilor F' și a merozigoților.
9. Într-un experiment de transformare, ADN-ul donor a fost obținut dintr -o tulpină bacteriană prototrofă *(a* ' b * c +), receptorul fiind ° tulpină triplă auxotrofă (u *bc).* Ce concluzii se pot trage despre relațiile de linkage dintre aceste trei gene din clasele transformante rezultate?

a' b~ c~	180
ab c~*	150
a fi	210
*a b ~ c**	179
un *b~ c**	2
ab C**	1
a b* C**	3

10. Descrieți rolul formării heteroduplexurilor în timpul transformării .
11. Explicați observațiile care i-au condus pe Zinder și Lederberg la concluzia că prototrofele recuperate în experimentele lor de transducție nu au fost rezultatul conjugării mediate de factorul F^+ .
12. Definiți termenii chelie, lizogenie și profag.
13. Explicați diferențele dintre transducția generalizată și cea specializată
14. Două tulpini virale teoretice *(a, b , c* și be) au fost utilizate pentru a infecta simultan o cultură a unei bacterii gazdă. Dintre cele 10.000 de pete cutanate numărate, au fost observate următoarele genotipuri . Determinați harta genetică a acestor trei gene pe cromozomul viral. Decideți dacă interferența este pozitivă sau negativă.

*a' b' c**	4.100	*a b 'c*	160
abe	3.990	*a' bc~*	140
a' b c	740	*ab c~*	90
ab~ c~	670	*a, b, c*	110

15. bacteriofagului constă în principal din gene care codifică proteinele care formează fibrele capului, gulerului, cozii și cozii . Când aceste gene sunt transcrise după infecția cu fagi, cum sunt sintetizate aceste proteine, deoarece genomul fagului nu are genele esențiale pentru structura ribozomilor ?
16. Dacă un singur bacteriofag *infectează* o celulă de E. coli Dacă un virus se găsește într -o peluză bacteriană și, după liză , se produc 200 de virusuri viabile , câți fagi vor exista într-o zonă cu chelie dacă au loc doar încă trei cicluri?
17. cultură bacteriană infectată cu fagi a fost supusă unei serii de diluții , iar în fiecare caz s-a efectuat un test de chelire , rezultatele fiind prezentate mai jos. Ce concluzii se pot trage din fiecare dintre diluții, presupunând că s-a utilizat 0,1 lm /L în fiecare test de chelire ?
18. În studiile de recombinare a locusului *rii* în fagul T4, care este semnificația valorii determinate la calcularea raportului dintre creșterea

	Factorul de diluție	Rezultatele procesului
(»)	10"	Toate bacteriile lizate
(b)	10^{5}	1,4 puncte chelite
(<)	10'	0 puncte de chelie

21. O altă mutație, 6, a fost găsită în legătură cu mutațiile 1 până la 5 din fagului în tulpina K12 și tulpina B de *E. coli* după infecția simultană cu *E. coli* ? B? Care valoare va fi întotdeauna mai mare?
19. Într-o analiză a altor mutanți *rii* , testele de complementare au dat următoarele rezultate:

Mutanți	Rezultate (liză +/ —)
1.2	+
1.3	+
1.4	—
1,5	-

(a) Preziceți rezultatele verificând împreună 2 și 3, 2 și 4 și 3 și 4.
(b) Dacă teste suplimentare ar da următoarele rezultate , ce ați concluziona despre mutantul 5?

Rezultate	Mutanți
2, 5	-
3.5	
4.5	-

20. Folosind mutanții 2 și 3 din problema anterioară , după infecția mixtă cu *E. coli* B, virusurile urmașe au fost însămânțate , la diferite diluții, în ambele tipuri *de E. coli* B ca în K12, cu următoarele rezultate. Care este frecvența de recombinare dintre acești doi mutanți?

Tulpină plantată	Diluare	Chelie
E. coli B	10 secunde	2
E. coli K1 2	10'	5

problema anterioară. Într -un test inițial, mutantul 6 se recombină cu mutanții 2 și 3. Într -un test de recombinare cu 1, 4 și 5, mutantul 6 se recombină cu 1 și 5, dar nu și cu 4. Ce puteți concluziona despre mutația 6?

Problemas extrapicantes

22. Când se analizează șapte mutații *rii* Dintre fagul T4, mutanții 1 , 2 și 6 au fost localizați în cistronul A, în timp ce mutanții 3, 4 și 5 au fost localizați în cistronul B. Dintre aceștia, mutantul 4 a fost o deleție care s-a suprapus cu mutantul 5. Mutațiile rămase au fost mutații punctuale. Nu se știa nimic despre mutantul 7. Preziceți rezultatele complementării (+ sau -) între 1 și 2; 1 și 3; 2 și 4; și 4 și 5.
23. În studiile de recombinare între mutanții 1 și 2 din problema anterioară, s-au obținut următoarele rezultate .

Tulpina	Diluare	Chelie	Fenotipuri
E. coli B.	10^{7}	4	*r*
E. coli K12	10^{-2}	8	

(a) Calculați frecvența de recombinare.
(b) Când a fost verificată recombinarea mutantului 6 cu mutantul 1, datele au fost aceleași cu cele prezentate pentru tulpina B , dar nu și pentru tulpina K12 . Un cercetător a pierdut datele pentru K12, dar și-a amintit că recombinarea a fost de 10 ori mai frecventă decât atunci

MGI

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com

când a fost verificată mutanții 1 și 2. Care au fost datele lipsă (diluție și număr de colonii)?
(c) Mutantul 7 (Problema 22) nu a complementat niciuna dintre celelalte mutații (1-6). Definiți natura mutantului 7.
24. În *Bacillus subtilis,* Analiza de legătură a două gene care afectează sinteza aminoacizilor triptofan *(trp2) și* tirozină (Tyr) a fost efectuată utilizând transformarea. Examinați datele furnizate mai jos și trageți toate concluziile posibile privind legătură . Care este scopul părții B a experimentului? [Referință: E. Nester, M. Schafer și J. Lederberg (1963).]

ADN-ul donatorului	Celulă receptoare	Transformatoare		N*
A. *trp* 2 tyr,		*trp*	*tyr*~	196
		trp	*tyr'*	328
		trp'		367
B. y „p;" trp 2	*trp* 2 *'y 2*	*trp'*	*tyr*	190
		trp	*tyr'*	256
		trp ¹	*tyr'*	2

25. Sc a utilizat o tulpină Hfr pentru a mapa trei gene folosind un experiment de conjugare întreruptă. Încrucișarea a fost Hfr */ao c rifX F la be rif'* . (Ordinea alelelor nu implică ordinea lor pe hartă; *rifT* reprezintă rezistența la antibioticul rifampicină.) Gena *a'* este necesară pentru biosinteza nutrientului A · gena *b*~ pentru nutrientul B și gena *c* pentru nutrientul C. Alelele negative sunt auxotrofe pentru acești nutrienți. Încrucișarea a fost inițiată la momentul *t* = 0, iar la momente diferite, amestecuri ale încrucișării au fost placate pe trei tipuri de medii. Fiecare placă conținea mediul minim (MM) și rifampicină plus suplimentul specific indicat în tabelul următor. (Rezultatele pentru fiecare interval de timp sunt prezentate ca număr de colonii care cresc pe fiecare placă.)

	Timp de întrerupere			
	5 minute	10 minute	15 minute	20 de minute
Nutrienții A și B	0	0	4	21 de ani
Nutrienții B și C	0	5	23 de ani	40
Nutrienții A și C	4	25	60	82

(a) Care este rolul rifampicinei în experiment?
(b) Pe baza acestor *date* , determinați locația aproximativă pe cromozom a genelor *a, b* și c . între ele și în raport cu factorul E
(c) Poate fi determinată locația genei *rif* ? în acest experiment? Dacă nu , proiectați un experiment pentru a localiza gena rif *în* relație cu factorul F și gena b .

26. Un test de chelire se efectuează începând cu 1 ml dintr- o soluție care conține bacteriofagi. Această soluție este diluată în serie de trei ori prin combinarea a 0,1 ml din fiecare diluție secvențială cu 9,9 ml de mediu lichid. Apoi, 0,1 ml din diluția finală este placată pentru un test de chelire , rezultând 17 pete de chelire . Care este densitatea inițială a bacteriofagilor în ml-ul original?

27. Într -un experiment de cotransformare , folosind diverse combinații de gene , câte două odată , s-au obținut următoarele date . Determinați care gene sunt „legate" cu altele.

Co-transformare reușită	Co-transformare nereușită
ayd; byc; byf	*a și b; ayc, ayf; d și b; d și c; dyf ay e\by e\cy edye; f și e*

2 8 Având în vedere datele din Problema 27, a fost studiată o altă genă, g . Când a fost testată cu gena /, aceasta a arătat o cotransformare pozitivă. Preciziți rezultatele experimentelor atunci când a fost testată cu genele *a, b, c, d și e.*

29. Conjugarea bacteriană, în principal prin plasmide conjugative precum F , reprezintă o potențială amenințare la adresa sănătății prin partajarea genelor patogene sau de rezistență la antibiotice . Având în vedere că peste 400 de specii diferite de bacterii coexistă în intestinul uman sănătos și peste 200 pe piele, Francisco *Dionisio* a investigat capacitatea plasmidelor pentru transferul interspecii prin conjugare. Datele prezentate mai jos implică mai multe specii din genul *Escherichia enterobacterium.* Datele sunt prezentate ca valori logaritmice în bază -10; de exemplu , -2,0 ar fi echivalent cu 10^{-10} ca rată de transfer . Presupunem că toate diferențele dintre valorile prezentate sunt semnificative statistic.
(a) Ce concluzie sau concluzii generale s-ar putea trage din aceste date?
(b) La ce specie este cel mai probabil transferul intraspecific ? Între ce pereche de specii este cel mai probabil transferul interspecific ?
(c) Care este semnificația acestor descoperiri în raport cu sănătatea umană ?

	Donator			
Receptor	*E. chrysanthemi*	*E. blattae E*	*fergusonii E. coli*	
E. *crizantemă*	-2,4	-4,7	-5,8	-3,7
E. blattae	-2.0	-3,4	-5,2	-3,4
E. fergusonii	„3,4	-5.0	-5,8	-4,2
E. coli	-1,7	-3,7	-5,3	-3,5

30. A fost efectuat un studiu pentru a determina ce regiuni funcționale ale unei gene de transfer conjugativ (*trai)* sunt implicate în transferul plasmidei Salmonella enterica R27 . Plasmida R27 prezintă un interes clinic semnificativ , deoarece poate codifica rezistența multiplă la antibiotice pentru febra tifoidă. Pentru a identifica regiunile funcționale responsabile de transferul conjugativ , Lawley și colab. (2002. *J. Bacteriol.* 184:2173-2180) au efectuat o analiză în care regiuni specifice ale genei *trai* au fost mutate și testate pentru impactul lor asupra conjugării. O hartă a regiunilor testate, despre care se credea că sunt implicate în transferul plasmidei conjugative, este prezentată mai jos. O culoare similară indică o funcție înrudită . Numerele corespund fiecărei regiuni funcționale supusă analizei mutaționale.

2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 13

Împreună cu harta, este furnizat un tabel care prezintă efectele acestor mutații asupra conjugării genei R27.

Efectul mutațiilor asupra regiunilor funcționale ale regiunii de transfer 1 *(trai)* despre conjugarea lui R27

Mutația R27 în regiune	Transfer conjugativ	Frecvența relativă a conjugării (%)
1	+	100
2	+	100
3	—	0
4	+	100
5	—	0
6	—	0
7	+	12
8	—	0
9	-	0

(Continuare)

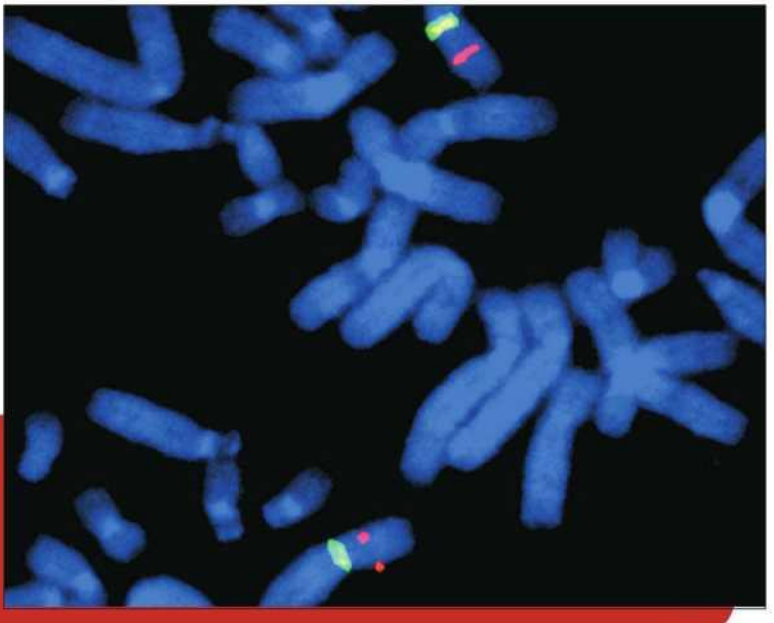
Mutația R27 în regiune	Transfer conjugativ	Frecvența relativă a conjugării (%)
10	—	0
11	+	13
12	—	0
13	—	0
14	—	0

(a) Având în vedere datele de mai sus, par toate regiunile funcționale să influențeze transferul conjugativ?
(b) Care regiuni par să aibă cel mai mare impact asupra conjugării ?
(c) Care regiuni par să aibă un impact limitat asupra conjugării?
(d) Ce concluzii generale se pot trage din aceste date?

31. Gripa este responsabilă pentru între 250.000 și 500.000 de decese anual, dar periodic face un număr mult mai mare de victime. De exemplu, pandemia de gripă din 1918 a ucis aproximativ 30 de milioane de oameni la nivel mondial și este considerată cea mai răspândită epidemie a unei boli mortale din istoria înregistrată. Având în vedere că apar periodic tulpini de gripă extrem de virulente, nu este surprinzător faptul că comunitatea științifică studiază activ biologia gripei. În 2007, Institutul Național pentru Alergii și Boli Infecțioase a finalizat secvențierea a 2.035 de tulpini de gripă umană și aviară . Tulpinile de gripă suferă recombinare, așa cum este descris în acest capitol, și au o rată ridicată de mutație datorită mecanismului predispus la erori de replicare a genomului lor (care este compus din ARN mai degrabă decât ADN). În plus, sunt capabile de rearanjări cromozomiale, prin care diverse combinații ale celor opt cromozomi ai lor (sau părți ale acestora) pot fi ambalate în descendenți virali atunci când două sau mai multe tulpini infectează aceeași celulă . Rezultatul final este că putem dezvolta vaccinuri, dar acestea trebuie modificate anual și , chiar și atunci, putem încerca doar să eliminăm anumite tulpini virale care vor fi prevalente* într-un an dat. Având în vedere aceste informații, luați în considerare următoarele întrebări:

(a) au ratele ridicate de mutație și recombinare, combinate cu rearanjamentele cromozomiale, pentru virusurile gripale ?
(b) De ce nu pot oamenii combate gripa în același mod în care combatem oreionul , rujeola sau variola?
(c) De ce există vaccinuri pentru multe boli virale , dar nu și pentru gripă ?

7



Cromozomi X umani marcați folosind hibridizarea *in situ fluorescentă* (FISH), o metodă în care o serie de sonde specifice se leagă de secvențe specifice de ADN. Sonda care produce fluorescență verde se leagă de ADN-ul centromeric al cromozomilor X. Sonda care produce fluorescență roșie se leagă de secvența de ADN a genei distrofiei musculare Duchenne (DMD), care este legată de X.

Determinarea sexului și cromozomii sexuali

CONCEPTE CAPITOL

►► **În organisme, a evoluat o mare varietate de mecanisme care dau naștere la diferențierea sexuală, ducând la dimorfism sexual și crescând considerabil producția de variație genetică în cadrul speciilor.**

►► **Adesea, gene specifice, de obicei pe un singur cromozom, dau naștere masculinității sau feminității în timpul dezvoltării.**

La specia umană, prezența unui cromozom X sau Y suplimentar dincolo de numărul diploid poate fi tolerată , dar adesea dă naștere la

sindroame care prezintă fenotipuri caracteristice.

►> Deși segregarea cromozomilor care determină sexul ar duce teoretic la un raport de sexe de unu la unu între masculi și femele , la specia umană acest raport este denaturat la concepție în favoarea masculilor.

La mamifere, femelele au doi cromozomi X , comparativ cu unul la masculi , dar informația genetică suplimentară la femele este compensată prin inactivarea aleatorie a unuia dintre cromozomii X în fazele incipiente ale dezvoltării.

►► La unele specii de reptile , temperatura din timpul incubării ouălor determină sexul puilor .

«•—» În lumea biologică, se recunoaște o mare varietate

Varietate de tipuri de reproducere și cicluri de viață. Unele organisme sunt complet asexuate , neprezentând nicio dovadă de reproducere sexuată. Altele alternează perioade scurte de reproducere sexuată cu perioade prelungite de reproducere asexuată. Cu toate acestea, la multe organisme eucariote diploide, reproducerea sexuată este singurul mecanism natural care dă naștere la noi membri ai speciei. Transmiterea ordonată a materialului genetic de la părinți la urmași și, de asemenea, a oricărei variabilități fenotipice, se bazează pe procesele de segregare și transmitere independentă care au loc în meioză. Meioza dă naștere la gameți haploizi, astfel încât, după fertilizare, urmașii rezultați mențin numărul diploid de cromozomi caracteristic speciei lor. Prin urmare, meioza asigură constanța genetică între membrii aceleiași specii.

Aceste procese, care sunt legate de perpetuarea tuturor organismelor cu reproducere sexuată, depind în cele din urmă de unirea cu succes a gameților în timpul fertilizării. La rândul său, succesul fertilizării depinde de existența unei forme de diferențiere sexuală în organismele reproducătoare. Chiar dacă nu este ușor evidentă, această diferențiere apare la organisme diverse precum bacteriile, archaea și eucariotele unicelulare, cum ar fi algele. La multe specii de animale, inclusiv la oameni, diferențierea sexelor este mai evidentă, manifestându-se ca dimorfism fenotipic între masculi și femele. Simbolul antic pentru fier și Marte, care reprezintă un scut și o suliță (cT), și simbolul pentru cupru și Venus, care reprezintă o oglindă (9), au ajuns, de asemenea, să simbolizeze masculinitatea și, respectiv, feminitatea.

Cromozomii disimilari sau heteromorfi, cum ar fi perechea XY la mamifere, caracterizează un sex sau altul la o gamă largă de specii, de unde și denumirea lor: cromozomi sexuali. Cu toate acestea, la multe specii, genele, mai degrabă decât cromozomii , servesc în cele din urmă drept bază pentru determinarea sexului. După cum vom vedea, unele dintre aceste gene sunt situate pe cromozomii sexuali, în timp ce altele sunt autozomale. Cercetări ample au relevat o mare varietate de sisteme de cromozomi sexuali, chiar și la organisme strâns înrudite, sugerând că mecanismele care controlează determinarea sexului au suferit o evoluție rapidă în multe ocazii de-a lungul istoriei vieții .

În acest capitol vom trece în revistă câteva tipuri reprezentative de diferențiere sexuală, examinând ciclurile de viață a trei organisme model studiate adesea în genetică: alga verde * *Chlamydomonas*;* planta de porumb * *Zea mays*;* și nematodul **Caenorhabditis elegans**. Aceste organisme vor servi la contrastarea diferitelor roluri pe care diferențierea sexuală le joacă în viața diverselor organisme . Apoi, vom aprofunda ceea ce se știe despre baza genetică a determinării diferențelor sexuale, cu accent deosebit pe alte două organisme : propria noastră specie, reprezentând mamiferele, și Drosophila . subiect al primelor studii privind determinarea sexului .

ESI

Ciclurile biologice depind de diferențierea sexuală

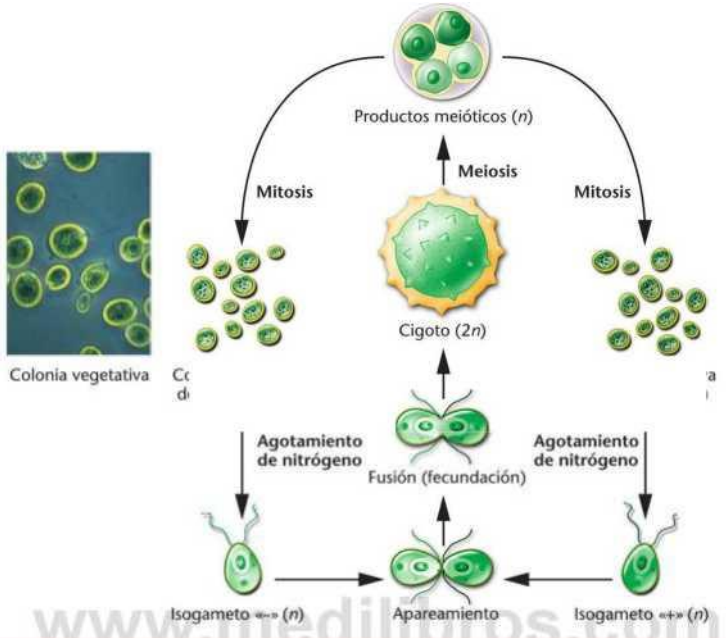
■

În descrierea dimorfismului sexual (diferențele dintre masculi și femele) la animalele multicelulare, biologii fac distincție între diferențierea sexuală primară, care implică doar gonadele în care se produc gameții , și diferențierea sexuală secundară, care implică - aspectul general al organismului, inclusiv diferențele evidente în organe precum glandele mamare și organele genitale externe , precum și în organele nereproductive. La plante și animale, termenii unisexual, dioic și gonocoric sunt echivalenți; toți se referă la indivizi care au doar organe reproducătoare masculine *sau feminine* . În schimb, termenii bisexual, monoic și hermafrodit se referă la indivizi care au atât organe reproducătoare masculine , cât și feminine , lucru care se întâmplă frecvent în regnurile animal și vegetal . Aceste organisme pot produce atât ovule , cât și spermatozoizi. Termenul intersex este de obicei rezervat indivizilor cu diferențiere sexuală intermediară, care sunt foarte adesea sterili.

Chlamydomonas

Ciclul de viață al algei verzi *Chlamydomonas * , prezentat în Figura 7.1, este reprezentativ pentru organismele care prezintă rareori perioade de reproducere sexuată . Astfel de organisme își petrec cea mai mare parte a ciclului de viață în faza haploidă, producând celule fiice asexuat prin diviziune mitotică. Cu toate acestea, în condiții nutriționale nefavorabile , cum ar fi epuizarea azotului , anumite celule fiice funcționează ca gameți, unindu-se în timpul fertilizării . După fertilizare , se formează un zigot diploid , care poate rezista mediului nefavorabil. Când condițiile devin mai potrivite, are loc meioza , iar celulele vegetative haploide sunt produse din nou .

La astfel de specii există puține diferențe vizibile între celulele vegetative haploide care se reproduc asexuat și gameții haploizi implicați în reproducere.



www.medilibros.com

FIGURA 7.1 Ciclo biológico de *Chlamydomonas*. Las condiciones desfavorables estimulan la formación de isogametos de tipos de apareamiento opuestos, que se pueden fusionar en la fecundación. El cigoto resultante sufre meiosis, dando lugar a dos células haploides de cada tipo de apareamiento. La fotografía muestra células vegetativas de esta alga verde.

sexuale. În plus, cei doi gameți care fuzionează în mod normal nu sunt distingibili din punct de vedere morfologic, motiv pentru care sunt numiți izogameți (deci - înseamnă egal sau uniformi). Speciile care îi produc se numesc izogame.

gameții *Chlamydomonas* pot fi subdivizați în două tipuri de împerechere . Lucrând cu clone derivate dintr -o singură celulă haploidă, au arătat că celulele dintr-o clonă se pot încrucișa cu celule din alte clone, dar nu cu toate. Când au testat capacitatea de împerechere a unui număr mare de clone, toate au putut fi plasate într -una din cele două categorii de împerechere: fie celule *mitocondriale* , fie *celule mitocondriale.* Celulele „plus" se încrucișează doar cu celulele „minus" și invers. După fertilizare, care implică fuziunea celulelor întregi și meioza ulterioară, cele patru celule haploide produse, sau zoospori (*vezi* Partea superioară a Figurii 7.1) a fost formată, așa cum s-a verificat, din două de tipul plus și două de tipul minus.

Experimentele ulterioare au stabilit diferențe chimice între celulele plus și minus. Când extractele au fost preparate din celule *Chlamydomonas clonate* (sau flagelii acestora) și adăugate la celule de tip de împerechere opus , a avut loc aglutinarea. Această aglutinare nu a avut loc dacă extractul adăugat celulelor provenea din celule de același tip de împerechere. Aceste observații au sugerat că, în ciuda asemănărilor morfologice dintre izogameți, a avut loc o diferențiere chimică între ei . Prin urmare , există un tip primitiv de diferențiere sexuală la această algă, chiar dacă nu există nicio indicație morfologică că *o* astfel de diferențiere ar fi avut loc . Investigații ulterioare au stabilit că locusul mt se află pe cromozomul VI al Chlamydomonas și au identificat gena care mediază exprimarea tipului de *împerechere* mt . care este esențial pentru fuziunea celulară ca răspuns la epuizarea azotului .

Zea mays

În ciclul biologic al multor *plante* există o alternanță între *faza gametofitică* haploidă și faza *sporofitică diploidă (vezi* (Figura 2.13). Procesele de meioză și fertilizare leagă cele două faze ale ciclului de viață. Durata relativă a celor două faze variază în funcție de principalele

grupuri de plante. La unele plante fără semințe, cum ar fi mușchii, faza gametofită haploidă și structurile morfologice care reprezintă această fază sunt predominante. Opusul este valabil la plantele cu semințe.

Porumbul *(Zea mays) este* un exemplu de plantă cu semințe monoică, adică o plantă în care faza sporofitică și structurile morfologice care reprezintă acea fază sunt predominante în timpul ciclului de viață. Atât structurile masculine, cât și cele feminine se găsesc la planta adultă. Prin urmare, determinarea sexului trebuie să aibă loc diferit în diferite țesuturi ale aceluiași organism, așa cum este ilustrat în ciclul de viață al acestei plante (Figura 7*2). Staminele, sau inflorescențele masculine, produc celule mamă microspori diploizi, fiecare dintre acestea suferind meioză și dând naștere la patru microspori haploizi. La rândul său, fiecare microspor haploid se dezvoltă într-un microgametofit masculin matur - grăuntele de polen - care are doi nuclei de spermatozoizi cu genotipuri identice.

În pistilul sporofitului se află celule femele diploide comparabile, cunoscute sub numele de celule mamă megaspori. După meioză, doar unul dintre cei patru megaspori haploizi supraviețuiește. De obicei, se divide mitotic de trei ori, producând un total de opt nuclei haploizi identici genetic în sacul embrionar. Doi dintre acești nuclei, situați în apropierea centrului sacului embrionar, devin nucleii endospermului. La capătul micropil al sacului, unde intră spermatozoidul, se află încă trei nuclei: nucleul ovocitului și două sinergide. Cei trei nuclei antipodali rămași se grupează la capătul opus al sacului embrionar.

Polenizarea are loc atunci când granulele de polen intră în contact cu stigmatul pistilului și dezvoltă tuburi lungi de polen care cresc spre sacul embrionar. Când intră în contact la nivelul micropilului, nucleii spermatozoizilor intră în sacul embrionar. Unul dintre nucleii spermatozoizilor se unește cu nucleul din ovocitul haploid, iar celălalt se unește cu cei doi nuclei ai endospermului. Acest proces, cunoscut sub numele de *dublă fertilizare,* are ca rezultat nucleul diploid al zigotului și, respectiv, nucleul triploid al endospermului. Fiecare știulete de porumb poate avea până la 1.000 de astfel de structuri, fiecare dintre ele dezvoltându-se într-un bob de porumb. Dacă este lăsat să germineze, fiecare bob de porumb dă naștere unei noi plante, *sporofitul.*

Mecanismul determinării și diferențierii sexului la o plantă monoică precum *Zea mays,* în care țesuturile care formează atât - gameții masculini, cât și cei feminini au aceeași constituție genetică, a fost inițial dificil de înțeles. Cu toate acestea, descoperirea unui număr mare de gene mutante care perturbă formarea normală a inflorescenței masculine și a pistilului susține ideea că produșii normali ai acestor gene joacă un rol important în determinarea sexului, afectând diferențierea țesuturilor masculine sau feminine în diverse moduri.

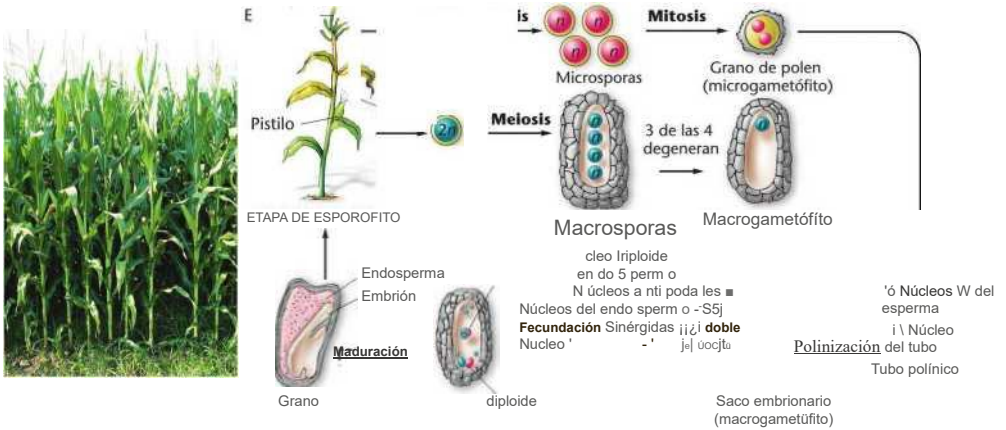


FIGURA 7.2 Ciclo biológico del maíz *(Zea* fn^ys). El esporófito diploide lleva estambres y pistilos que dan lugar a microsporas y macrosporas haploides, que dan lugar al grano de polen y al saco embrionario que finalmente albergan al esperma y al oocito, respectivamente. Después de la fecundación, el embrión se desarrolla dentro dei grano y se nutre por el endosperm o. La germinación del grano da lugar a un nuevo esporofita (la planta de maíz madura) y se repite el mismo ciclo.

De exemplu, genele mutante care modifică dezvoltarea sexuală a inflorescențelor oferă informații valoroase. Când sunt homozigote, mutațiile clasificate ca *gene cu semințe de tip tassel (tsl* și *ts2)* transformă inflorescențele masculine în pistile feminine. Tipul sălbatic al acestor gene elimină în mod normal celulele care formează pistilele, inducând moartea celulară. Prin urmare, o singură genă poate determina o plantă în mod normal monoică să devină exclusiv feminină. Pe de altă parte, mutațiile recesive *silkless (sk)* și *barren steep stem (ba)* interferează cu dezvoltarea pistilului, rezultând plante cu organe reproducătoare exclusiv masculine, cu condiția ca planta să aibă gene *ts* de tip sălbatic .

Datele colectate din studiile asupra acestor mutanți și a altora sugerează că produsele multor alele de tip sălbatic ale acestor gene interacționează în controlul determinării sexului. După diferențierea sexuală a inflorescențelor în structuri masculine sau feminine, se produc gameți masculini sau feminini.

Caenorhabditis elegans

Nematodul *Caenorhabditis elegans* [prescurtat C. *elegans ;* Figura 7.3(a)] a devenit un organism

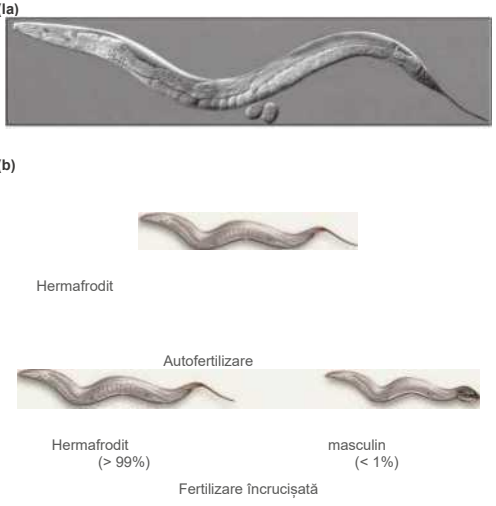


FIGURA 7.3 (a) Microfotografie a unui nematod hermafrodit, C. *elegans;* (b)

Rezultatele autofertilizării unui hermafrodit și ale încrucișării unui hermafrodit cu un mascul. Hermafroditul

este popular în studiile genetice, în special în investigațiile - controlului genetic al dezvoltării. Utilitatea sa se bazează pe faptul că hermafroditul adult este format din exact 959 de celule , iar soarta fiecărei celule poate fi urmărită de la originea sa embrionară specifică.

Acești viermi prezintă două fenotipuri sexuale: masculi, care posedă doar testicule, și hermafroditi, care dezvoltă două gonade în timpul dezvoltării larvare, producând ulterior atât spermă, cât și ovule. Ovulele produse sunt fertilizate de sperma stocată într-un proces de autofertilizare.

Rezultatul acestui proces este foarte interesant [Figura 7.3 (b)]. Marea majoritate a organismelor se dovedesc a fi hermafrodite, la fel ca viermele -mamă; mai puțin de 1 % dintre urmași sunt masculi. Masculii adulți se pot încrucișa cu hermafroditii, rezultând urmași care sunt aproximativ jumătate masculi și jumătate hermafroditi.

Semnalul genetic care determină masculinitatea versus hermafroditism este furnizat de gene situate atât pe cromozomul X, cât și pe autozomi . C. *elegans* nu are cromozomul Y. Hermafroditii au doi cromozomi X, în timp ce masculii au doar unul. Se crede că raportul dintre cromozomii X și numărul de seturi de autozomi determină sexul acestor nematode. Un raport de 1,0 (doi cromozomi X și două copii ale fiecărui autosom) are ca rezultat hermafroditi, iar un raport de 0,5 are ca rezultat masculi. Absența unui cromozom Y heteromorf nu este neobișnuită la organisme.

ACUM REZOLVĂ ASTA

7.1 Echiurida marină *Bonellia viridis* este un caz extrem de influență a mediului asupra determinării sexului . Larvele nediferențiate rămân libere și fie se diferențiază în femele , fie se atașează de trompa unei femele adulte și se dezvoltă în masculi. Dacă larvele care au rămas în trompa unei femele sunt îndepărtate pentru o perioadă scurtă de timp și plasate în apă de mare , se diferențiază în intersexe. Dacă larvele sunt forțate să se dezvolte într -un acvariu care conține bucăți de trompă, se dezvoltă în masculi. Comparați această metodă de diferențiere sexuală cu cea a mamiferelor . Sugerați experimente pentru *a* clarifica mecanismul determinării sexului la B. *viridis* .

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm rezultatele experimentale legate de determinarea sexului. Cheia rezolvării acesteia constă în dezvoltarea de teste suplimentare, cu scopul de a izola factorul necunoscut care afectează determinarea sexului și de a-l testa experimental.*

7.2

Cromozomii X și Y au fost asociați pentru prima dată cu determinarea sexului la începutul secolului al XX-lea.

Modul în care se determină sexul a intrigat de mult timp geneticienii. În 1891, H. Henking a identificat o structură în nucleul spermatozoizilor anumitor insecte, pe care a numit -o corpul X. Câțiva ani mai târziu, Clarance McClung a demonstrat că sperma unor lăcuste conținea o structură genetică rară, pe care a numit- *o heterocromozom,* dar restul spermatozoizilor nu aveau această structură. El a asociat în mod eronat prezența heterocromozomului cu producerea de urmași masculi. În 1906, Edmund B. Wilson a clarificat descoperirile lui Henking și McClung demonstrând că celulele somatice de la fluturii *Protenor* femele aveau 14 cromozomi , inclusiv doi cromozomi X. În timpul oogenezei, acest număr este redus, rezultând gameți cu șapte cromozomi, inclusiv un cromozom X. În schimb, celulele somatice masculine aveau doar 13 cromozomi, inclusiv un singur cromozom X. În timpul spermatogenezei, gameții sunt produși fie cu șase cromozomi, fără cromozom X, fie cu șapte cromozomi, dintre care unul este un cromozom X. Fertilizarea cu spermatozoizi purtători ai unui cromozom X are ca rezultat urmași de sex feminin, iar fertilizarea cu spermatozoizi fără cromozom X are ca rezultat urmași de sex masculin [Figura 7.4(a)].

Prezența sau absența cromozomului X în gameții masculini este un mecanism eficient pentru determinarea sexului la această specie și are ca rezultat, de asemenea, un raport de sexe de 1:1 la urmași. Acest mecanism, numit în prezent tipul XX/XO sau Protenor de determinare a sexului , Depinde de distribuția aleatorie a cromozomului X în jumătate din gameții masculini în timpul segregării. După cum am văzut anterior, C. *elegans* prezintă acest sistem de terminare a sexului .

Wilson a experimentat și cu hemipterul *Lygaeus turicus,* la care ambele sexe au 14 cromozomi . Doisprezece dintre aceștia sunt autozomi (A). În plus, femelele au doi cromozomi X, în timp ce masculii au un singur cromozom X și un mic heterocromozom numit cromozomul Y. Femelele acestei specii produc doar gameți cu constituția (6A-I-X), dar masculii produc două tipuri de gameți în proporții egale: (6A + X) și (6A + Y). Prin urmare, după fertilizarea aleatorie, se va produce un număr egal de urmași masculi și femele.

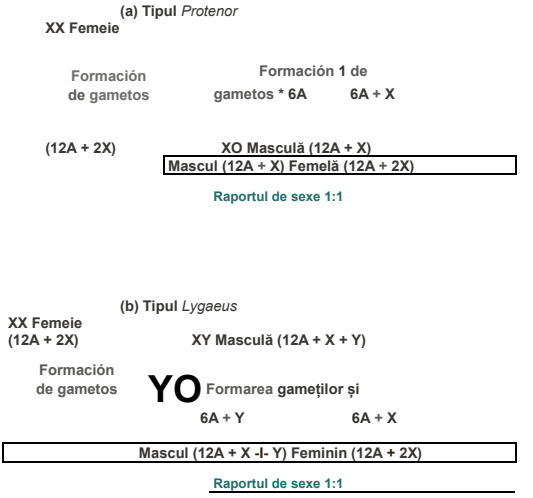

(a) Tipul Protenor
XX Femeie
Formación de gametos
Formación 1 de gametos * 6A
6A + X
(12A + 2X)
XO Mască (12A + X)
Mascul (12A + X) Femelă (12A + 2X)
Raportul de sexe 1:1
(b) Tipul Lygaeus
XX Femeie (12A + 2X)
XY Mască (12A + X + Y)
Formación de gametos
YO
Formarea gameților și
6A + Y
6A + X
Mascul (12A + X -I- Y) Feminin (12A + 2X)
Raportul de sexe 1:1

FIGURA 7.4 (a) Determinarea sexului de tip *Protenor* , în care sexul heterogametic (masculul în acest exemplu) este XO și produce gameți cu și fără cromozom X; (b) Determinarea sexului de tip *Lygaeus , în* care sexul heterogametic (din nou, masculul în acest exemplu) este XY și produce gameți cu fie un cromozom X , fie un cromozom Y. În ambele cazuri, compoziția cromozomială a urmașilor determină sexul acestora.

cu complemente cromozomiale diferite. Acest tip de determinare a sexului se numește *Lygaeus* sau XX/XY [Figura 7.4(b)].

La insectele Protenor și *Lygaeus,* masculii produc gameți diferiți unul de *celălalt* . Prin urmare, ei sunt numiți sex heterogametic , iar gameții lor determină în cele din urmă sexul urmașilor la aceste specii. În astfel de cazuri, femelele , care au cromozomi sexuali identici , constituie sexul homogametic, producând același tip de gameți în ceea ce privește numărul și tipul de cromozomi.

Masculul nu este întotdeauna de sex heterogametic. La alte organisme, femela produce gameți diferiți, prezentând un tip de determinare a sexului cunoscut sub numele de *Protenor* (XX/XO) sau *Lygaeus* (XX/XY). Exemplele includ anumite molii și fluturi, unii pești, reptile, amfibieni și cel puțin o specie de plante *(Fragaria orientatisi)* și majoritatea păsărilor. Pentru a distinge imediat situațiile în care femela este de sex heterogametic, unii geneticieni folosesc notația ZZ /ZW, unde ZZ este masculul homogametic și ZW este femela heterogametică, în loc de XX /XY. De exemplu , găinile sunt desemnate în acest fel.

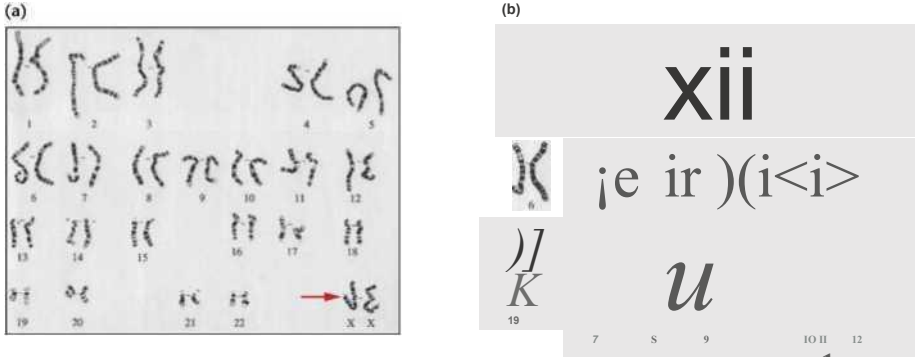


FIGURA 7.5 El tradicional cariotipo de la especie humana proveniente de una mujer y un varón normales. Cada uno tiene 22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. La mujer (a) tiene dos cromosomas X, mientras que el varón (b) tiene un cromosoma X y un cromosoma Y.

Cromozomul Y determină masculinitatea la oameni

Prima încercare de a înțelege determinarea sexului la specia noastră a avut loc acum aproape 100 de ani și a implicat examinarea vizuală a cromozomilor prezenți în celulele aflate în diviziune . S-au depus eforturi pentru a determina cu exactitate numărul diploid al cromozomilor umani, dar din cauza numărului relativ mare de cromozomi, acest lucru a fost foarte dificil. În 1912, H. von Winiwarter a numărat 47 de cromozomi în preparatele de spermatogen în metafază. Se credea că mecanismul determinării sexului la oameni se baza pe prezența unui cromozom suplimentar la femele, care ar avea apoi 48 de cromozomi. Cu toate acestea, în anii 1920, Theophilus Painter a numărat între 45 și 48 de cromozomi în celulele țesutului testicular și a descoperit, de asemenea, micul cromozom Y, despre care știm acum că se găsește doar la bărbați. În lucrarea sa originală, Painter a sugerat 46 ca număr diploid la oameni, dar ulterior a concluzionat incorect că numărul de cromozomi era de 48 atât la bărbați, cât și la femei.

a fost acceptat timp de 30 de ani . Apoi, în 1956, Joe Hin Tjio și Albert Levan au descoperit o metodă mai bună de preparare a cromozomilor. Această îmbunătățire tehnică a condus la o preparare foarte clară a metafazelor, demonstrând că numărul diploid la oameni era de fapt 46. Mai târziu în același an, C.E. Ford și John L. Hamerton, care lucrau și ei cu țesut testicular, au confirmat această descoperire. Cariotipul familial uman este prezentat în Figura 7.5 .

Dintre cele 23 de perechi normale de cromozomi umani , o pereche are o configurație diferită la bărbați și femei. Acești doi cromozomi sunt denumiți cromozomii sexuali X și Y. Femelele au doi cromozomi X , iar bărbații au un cromozom X și un cromozom Y.

Am putea crede că această observație este suficientă pentru a concluziona că cromozomul Y determină masculinitatea . Cu toate acestea, sunt posibile și alte interpretări . Cromozomul Y s-ar putea să nu joace un rol în determinarea sexului ; prezența a doi cromozomi X ar putea duce la feminitate ; sau masculinitatea ar putea rezulta din absența celui de -al doilea cromozom X. Dovezile care au clarificat care explicație a fost corectă au trebuit să aștepte studiul variației compoziției cromozomilor sexuali umani , care este descris mai târziu. După cum au arătat astfel de cercetări, cromozomul Y determină într-adevăr masculinitatea la oameni.

Sindroamele Klinefelter *și* Turner

În jurul anului 1940, oamenii de știință au identificat două anomalii umane caracterizate prin dezvoltare sexuală anormală: sindromul Klinefelter (47, XXY) și sindromul Turner (45, X) ††. Persoanele cu sindrom Klinefelter au, de obicei, organe genitale masculine și canale interne , dar testiculele lor sunt rudimentare și nu produc spermatozoizi. În același timp, dezvoltarea sexuală feminină nu este complet suprimată. O ușoară mărire a glandelor mamare (ginecomastie) este frecventă, iar șoldurile sunt adesea rotunjite. Această dezvoltare sexuală ambiguă, numită intersexualitate, poate duce la o dezvoltare socială anormală . Inteligența este adesea sub limita normală .

FIGURA 7.6 Cariotipurile indivizilor cu (a) sindrom Klinefelter (47,XXY) si cu (b) sindrom Turner (45,X).

În sindromul Turner, persoanele afectate au organe genitale externe feminine și canale interne, dar ovarele lor sunt rudimentare. Alte anomalii caracteristice includ statură mică (de obicei sub 1,5 metri), probleme cognitive, pliuri cutanate la ceafă și sâni subdezvoltați. Uneori se observă un torace lat, asemănător unui scut. În 1959, au fost determinate cariotipurile persoanelor cu aceste sindroame, dezvăluind anomalii ale cromozomilor sexuali. Persoanele cu sindrom Klinefelter au mai mult de un cromozom X. Cel mai frecvent, acestea au un complement XXY pe lângă cei 44 de autozomi [Figura 7.6(a)], motiv pentru care persoanele cu acest cariotip sunt desemnate 47,XXY. Persoanele cu sindrom Turner sunt foarte des monosomice și au doar 45 de cromozomi, inclusiv un singur cromozom X, și, prin urmare, sunt desemnate 45X [Figura 7.6(b)]. Rețineți convenția utilizată pentru a desemna aceste compoziții cromozomiale: numărul indică numărul total de cromozomi prezenți, iar simbolurile de după virgulă specifică abaterea de la conținutul diploid normal. Ambele condiții rezultă din non-disjuncție, eșecul segregării corecte a cromozomilor X în timpul meiozei (non-disjuncția este descrisă în Capitolul 8 și ilustrată în Figura 8.1).

Aceste cariotipuri Klinefelter și Turner și fenotipurile lor sexuale corespunzătoare i-au condus pe oamenii de știință la concluzia că cromozomul Y determină masculinitatea și, prin urmare, este baza determinării fenotipice a sexului la oameni. În absența acestuia, sexul individului este feminin, chiar dacă este prezent un singur cromozom X. Prezența cromozomului Y la indivizii cu sindrom Klinefelter este suficientă pentru a determina masculinitatea, chiar dacă dezvoltarea masculină nu este completă. În mod similar, în absența unui cromozom Y, ca în cazul indivizilor cu sindrom Turner, masculinizarea nu are loc. Rețineți că nu putem trage nicio concluzie cu privire la determinarea sexului în circumstanțele în care este prezent un cromozom Y fără un X, deoarece embrionii umani care conțin cromozomul Y , dar nu și X (desemnați 45 ,Y) nu supraviețuiesc .

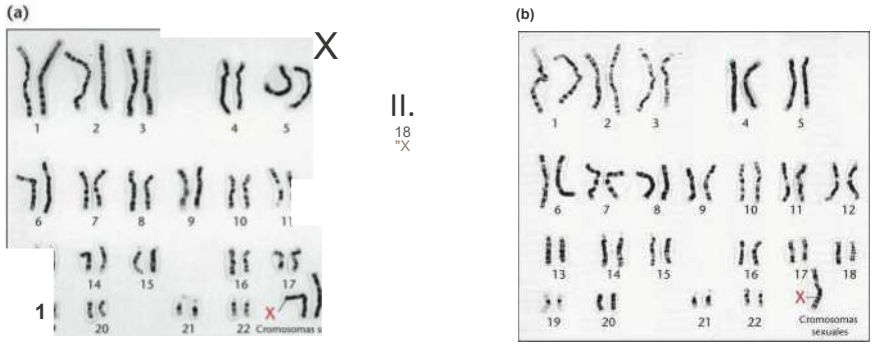
Sindromul Klinefelter apare la aproximativ 1 din 660 de nașteri de sex masculin . Cariotipurile 48 , XXXY, 48, XXYY, 49, XXXXY și 49, XXXYY sunt fenotipic similare cu 47, XXY, dar manifestarea este adesea mai severă la persoanele cu un număr mai mare de cromozomi X.

Sindromul Turner poate apărea și la cariotipuri diferite de 45,X, inclusiv la indivizi cunoscuți sub numele de mozaici, ale căror celule somatice au două linii celulare genetice distincte , fiecare - exprimând un cariotip diferit. Astfel de linii celulare rezultă din erori în mitoză la începutul dezvoltării, cele mai frecvente combinații cromozomiale fiind 45,X/46,XY și 45,X/46,XX. Astfel, un embrion care începe dezvoltarea cu un cariotip normal poate da naștere unui individ ale cărui celule prezintă un amestec de cariotipuri și care prezintă diferite aspecte ale acestui sindrom.

Sindromul Turner apare la aproximativ 1 din 2.000 de nașteri de sex feminin, o frecvență mult mai mică decât sindromul Klinefelter . O explicație pentru această diferență este faptul că o majoritate substanțială a fetușilor Turner mor in *utero* . și suferă avorturi - spontane . Prin urmare, la concepție, ar putea exista o frecvență similară pentru ambele sindroame.

Sindromul 47,XXX

Prezența anormală a trei cromozomi X , împreună cu un complement normal de autozomi (47,XXX), are ca rezultat diferențierea feminină . Sindromul extrem de variabil care însoțește acest genotip, uneori numit triplo -X, este



Apare la aproximativ 1 din 1.000 de nașteri de sex feminin. Frecvent, femeile cu cromozomul 47,XXX sunt perfect normale și pot să nu fie conștiente de anomalia lor cromozomială decât dacă se efectuează un cariotip. În alte cazuri, pot exista caracteristici sexuale secundare subdezvoltate, precum și infertilitate, întârzieri în dezvoltarea limbajului și motorie și dizabilități intelectuale. În cazuri rare, au fost descoperite cariotipuri 48,XXXX (tetra-X) și 49,XXXX (penta-X). Sindroamele asociate cu aceste cariotipuri sunt similare, dar mai pronunțate decât cele ale sindromului 47,XXX . Astfel, în multe cazuri, prezența unui cromozom X suplimentar pare să perturbe echilibrul delicat al informațiilor genetice esențiale pentru dezvoltarea normală a unei femei.

Condiția 47, XYY

O altă afecțiune care implică cromozomii sexuali este 47,XYY. Studiile asupra acestei afecțiuni, în care singura abatere de la diploidie este prezența unui cromozom Y suplimentar într -un cariotip masculin altfel normal , au fost inițiate în 1965 de Patricia Jacobs. Această cercetătoare a descoperit că 9 dintre cei 315 bărbați dintr-o închisoare de maximă securitate scoțiană aveau cariotipul 47,XYY. Acești bărbați erau semnificativ mai înalți decât media și fuseseră închiși pentru acte criminale antisociale (non-violente). Dintre cei nouă bărbați studiați, șapte aveau o inteligență sub medie și toți sufereau de tulburări de personalitate . Alte studii au dat rezultate similare.

Posibila corelație dintre această compoziție cromozomială și comportamentul infracțional a stârnit un interes considerabil și cercetări ample asupra fenotipului și frecvenței afecțiunii 47,XYY rezultată , atât în populațiile infracționale, cât și în cele non-infracționale . În general, s - au observat o înălțime peste medie (de obicei peste 1,80 metri) și o inteligență sub medie , iar frecvența bărbaților cu acest cariotip este de fapt mai mare în rândul celor din instituțiile penale și psihiatrice decât în rândul populației neîncarcerate *(a se vedea* tabelul 7.1). O întrebare deosebit de relevantă se referă la caracteristicile bărbaților XYY neîncarcerați . Aproape singura asociere consistentă este că acești indivizi au o înălțime de aproximativ 1,80 metri .

A fost inițiat un studiu pentru a identifica indivizii cu cromozomul 47,XYY la naștere și pentru a le urmări tiparele de comportament în timpul dezvoltării juvenile și adulte. Până în 1974, doi cercetători, Stanley Walzer și Gerald Park, identificaseră aproximativ 20 de nou-născuți XYY din 15.000 de nașteri la Spitalul de Femei din Boston. Cu toate acestea, în curând s-au confruntat cu presiuni considerabile pentru a-și abandona cercetarea. Oponenții au susținut că cercetarea ar putea să nu fie justificată și ar putea provoca daune semnificative persoanelor cu acest cariotip. Oponenții au susținut că : (1) nu s-a stabilit nicio asociere între cromozomul Y suplimentar și comportamentul anormal în populația generală și (2) „marcarea" unor astfel de indivizi în studiu ar putea crea o profeție autoîmplinită . Cu alte cuvinte, ca urmare a participării la studiu , părinții, rudele și prietenii ar putea trata indivizii identificați ca 47,XYY diferit, ducând în cele din urmă la comportamentul antisocial așteptat . În ciuda finanțării de la o agenție guvernamentală și de la Harvard Medical School, Walzer și Gerald și-au abandonat cercetarea în 1975.

Din munca lui Walzer și Gerald, este clar că există mulți bărbați XYY în populație care nu prezintă comportament antisocial și duc o viață normală . Prin urmare , trebuie să concluzionăm că există o corelație ridicată, dar nu constantă , între cromozomul Y suplimentar și predispoziția acestor bărbați de a prezenta probleme de comportament.

Diferențierea sexuală la oameni

Odată ce cercetătorii au stabilit că, la oameni , cromozomul Y poartă informațiile genetice necesare pentru masculinitate, s-au depus eforturi pentru a identifica o genă sau gene specifice capabile să furnizeze „semnalul" responsabil pentru determinarea sexului .

TABLA 7.1 1 Frecuencia de individuos XYY en varios escenarios

Escenario	Restricción	Número estudiado	Número de XYY	Frecuencia de XYY
Control de población	Recién nacidos	28.366	29	0,10%
Mental-penal	Ninguna restricción de estatura	4.239	82	1,93
Penal	Ninguna restricción de estatura	5.805	26	0,44
Mental	Ninguna restricción de estatura	2.562	8	0,31
Mental-penal	Restricción de estatura	1.048	48	4,61
Penal	Restricción de estatura	1.683	31	1,84
Mental	Restricción de estatura	649	9	1,38

Fuente: recopilado a partir de los datos presentados en Hook, 1973, Tabla 1-8. Copyright 1973 por American Association for the Advancement of Science.

Înainte de a aprofunda acest subiect, va fi util să luăm în considerare modul în care are loc diferențierea sexuală pentru a înțelege mai bine cum se dezvoltă oamenii în masculi și femele cu dimorfism sexual. În primele etape ale dezvoltării, fiecare embrion trece printr-o perioadă în care este potențial hermafrodit. În jurul celei de-a cincea săptămâni de gestație, primordiile gonadale (țesutul care va da naștere gonadelor) apar ca o pereche de creste gonadale (organele genitale) asociate cu fiecare rinichi embrionar. Embrionul este potențial hermafrodit deoarece, în această etapă, fenotipul său gonadal este indiferent sexual - structurile reproducătoare masculine și feminine sunt indistinguizabile, iar țesutul crestei gonadale se poate dezvolta fie în gonade masculine , fie în gonade feminine. Pe măsură ce dezvoltarea progresează , celulele germinale primordiale migrează către aceste creste, unde formează un cortex extern și o medulară internă (*cortexul și medulara fiind* țesuturile extern și intern ale unui organ, respectiv). Cortexul se poate dezvolta într-un ovar, în timp ce medulara se poate dezvolta într-un testicul. În plus, fiecare embrion conține două seturi de canale nediferențiate numite canalele Wolffian și Müllerian. Canalele Wolffian se diferențiază în alte organe ale sistemului reproducător masculin, în timp ce canalele Müllerian se diferențiază în structuri ale sistemului reproducător feminin.

Întrucât crestele gonadale pot forma fie ovare, fie testicule, acestea sunt adesea numite gonade bipotențiale. Ce determină dacă o creastă gonadală se dezvoltă într-un testicul sau într-un ovar ? Prezența sau absența unui cromozom Y este esențială . Dacă celulele crestei genitale au o constituție XY, dezvoltarea regiunii medulare în testicule începe în jurul celei de-a șaptea săptămâni . Cu toate acestea, în absența unui cromozom Y, nu are loc nicio dezvoltare masculină, iar cortexul crestei formează ulterior țesut ovarian, în timp ce ductul Müllerian formează oviductele (trompele uterine), uterul, colul uterin și părți ale vaginului . În funcție de calea inițiată, sistemul de ductele masculin sau feminin corespunzător se dezvoltă apoi în paralel, iar celălalt sistem de ductele generează țesut ovarian. Dacă începe diferențierea în testicule, țesutul testicular embrionar secretă hormoni esențiali pentru continuarea diferențierii sexuale masculine. După cum vom vedea în secțiunea următoare, prezența unui cromozom Y și dezvoltarea testiculelor inhibă, de asemenea, formarea organelor de reproducere feminine.

La femele, în jurul celei de-a douăsprezecea săptămâni de - dezvoltare fetală, ovogonia din ovare începe meioza și pot fi detectate ovocitele primare. În jurul celei de -a douăzeci și cincea săptămâni de gestație, meioza este oprită la toate ovocitele, iar acestea rămân latente până la pubertate, care este atinsă 10 până la 15 ani mai târziu. Pe de altă parte, la bărbați, spermatocitele primare nu se formează decât după pubertate *(vezi* Figura 2.12).

Cromozomul Y și dezvoltarea masculină. Multă vreme s-a crezut că cromozomul Y uman , spre deosebire de X , era în mare parte gol genetic. Acum se știe că acest lucru nu este adevărat, chiar dacă cromozomul Y conține considerabil mai puține gene decât X. Datele din Proiectul Genomului Uman indică faptul că cromozomul Y are cel puțin 75 de gene, comparativ cu cele 900 până la 1.400 de gene de pe cromozomul X. Analizele actuale ale acestor gene și regiuni cu funcție genetică potențială dezvăluie că unele dintre aceste gene au omologi pe cromozomul X, în timp ce altele nu. De exemplu , așa-numitele regiuni pseudoautosomale (PAR) sunt prezente la ambele capete ale cromozomului Y. Aceste regiuni sunt omoloage cu regiunile de pe cromozomul X cu care fac sinapsă și se recombină în timpul meiozei. Prezența unor astfel de regiuni de împerechere este esențială pentru segregarea cromozomilor X și Y în gametogeneza masculină. Restul cromozomului, aproximativ 95 % , nu face sinapsă și nu se recombină cu cromozomul X. Din acest motiv, inițial a fost numită regiunea *Y nerecombinante (NRY).* Mai recent, cercetătorii au desemnat-o *regiunea Y* specifică bărbaților (MSY). După cum vom vedea, unele părți ale MSY au omologie *cu* genele de pe cromozomul X , în timp ce altele nu.

Figura 7.7 prezintă o reprezentare schematică a cromozomului Y uman . MSY este împărțit în regiuni eucromatice aproximativ egale , conținând gene funcționale și *heterocromatice,* cărora le lipsesc genele . În eucromatină, lângă PAR-ul brațului scurt al cromozomului Y, există o genă esențială care controlează dezvoltarea sexuală masculină, în așa -numita *regiune* Y de determinare a sexului (SRY). La oameni, absența unui cromozom Y duce aproape întotdeauna la dezvoltarea feminină, deoarece

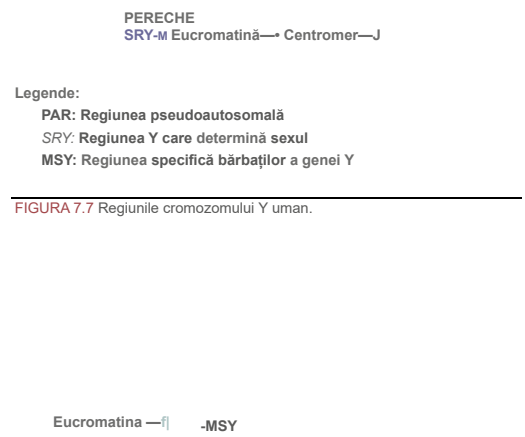


FIGURA 7.7 Regiunile cromozomului Y uman.

Această genă nu se găsește pe cromozomul X. Între șase și opt săptămâni de dezvoltare, gena SRY este activată în embrionii XY. *SRY* codifică o proteină care determină formarea testiculelor de către țesutul gonadal nediferențiat al embrionului . Această proteină se numește factor determinant al testiculelor (TDF) .

Gena *SRY* (sau o versiune strâns înrudită) se găsește la toate mamiferele examinate până în prezent, indicând rolul său esențial în acest grup divers de animale. Capacitatea noastră de a identifica prezența sau absența secvențelor de ADN la indivizi rari, a căror compoziție a cromozomilor sexuali nu corespunde fenotipului lor sexual, a furnizat dovezi că *SRY* este gena responsabilă pentru determinarea sexului masculin. De exemplu, unii masculi au doi cromozomi X și niciun cromozom Y. Adesea, la unul dintre cromozomii lor X se află regiunea cromozomului Y care conține *SRY.* În mod similar, unele femele au un cromozom X și un cromozom Y. Cromozomul lor Y aproape întotdeauna nu are *gena SRY.*

O susținere suplimentară pentru această concluzie provine din experimentele efectuate cu șoareci transgenici. Aceste animale sunt obținute din ouă fertilizate în care se injectează ADN străin, care este ulterior încorporat în structura genetică a embrionului în curs de dezvoltare. La șoarecii normali, a fost identificată o regiune cromozomială numită Sry, comparabilă cu *regiunea SRY* de la oameni. Când ADN-ul de șoarece care conține *Sry este injectat* în ouă de șoarece XX normale, majoritatea urmașilor se dezvoltă ca masculi.

Întrebarea despre cum produsul acestei gene induce țesutul gonadal embrionar să se dezvolte în testicule în loc de ovare a fost investigată de mulți ani. Se crede că TDF funcționează ca un *factor de transcripție,* o proteină de legare a ADN-ului care interacționează direct cu secvențele reglatoare ale altor gene pentru a stimula expresia acestora. Astfel, deși TDF se comportă ca un regulator principal care controlează alte gene mai departe în procesul de diferențiere sexuală, identificarea genelor specifice vizate de TDF s-a dovedit a fi o provocare. Până în prezent, o astfel de genă este *Sox9* la șoareci. O altă țintă potențială pentru activarea TDF care a fost studiată pe larg este gena pentru substanța inhibitoare Müllerianã *(MIS, numită* și hormon inhibitor Müllerian, MIH sau factor inhibitor Müllerian). Celulele din testiculele în curs de dezvoltare secretă MIS. După cum sugerează și numele, proteina

este că o genă similară a fost identificată recent la pui. Se numește *DMRT1.* Este situată pe cromozomul Z. Vom discuta această genă în problema 35, în secțiunea de probleme de la sfârșitul capitolului.

MIS provoacă regresia (atrofia) celulelor canalului müllerian . Degenerarea canalului împiedică formarea sistemului reproducător feminin.

Alte *gene autozomale* fac parte dintr- o cascadă de expresie genică inițiată de SRY. Exemplele includ gena umană *SOX9 ,* care , atunci când este activată de SRY , duce la diferențierea celulelor care formează tubulurile seminifere care conțin celule germinale masculine. La șoareci, factorul de creștere a fibroblastelor 9 *(Fgf9)* este reglat de gonadele XY. Dezvoltarea testiculară este complet blocată în gonadele cărora le lipsește *Fgf9,* cu semne de dezvoltare ovariană. O altă genă, *SF1,* Este implicată în reglarea enzimelor care afectează metabolismul steroizilor. La șoareci, această genă este inițial activă în creasta genitală bisexuală masculină și feminină , persistând până în punctul de dezvoltare în care formarea testiculului devine evidentă. Din acel moment, expresia sa persistă la masculi, dar se stinge la femele. Studii recente efectuate pe șoareci sugerează că dezvoltarea testiculară poate fi reprimată activ pe tot parcursul vieții femelelor prin prevenirea expresiei unor gene specifice. Acest lucru se bazează pe experimente care demonstrează că, la șoarecii femele adulți, ștergerea unei gene *Foxl2 ,* care codifică un factor de transcripție , duce la transdiferențierea ovarului într- un testicul. Stabilirea relației dintre aceste diverse gene și determinarea sexului ne facilitează înțelegerea pe deplin a modului în care apar masculii și femelele în specia umană , deși mai sunt multe de făcut.

Descoperirile făcute de David Page și numeroșii săi colegi au oferit o schiță destul de completă a regiunii MSY a cromozomului Y uman. Page a fost în fruntea studiului detaliat al cromozomului Y în ultimele decenii. MSY este alcătuit din aproximativ 23 de milioane de perechi de baze (23 Mb) și poate fi împărțit în trei regiuni. Prima este *regiunea X transpusă.* Aceasta cuprinde aproximativ 15 % din regiunea MSY și a derivat inițial din cromozomul X în timpul evoluției umane (acum aproximativ 3 până la 4 milioane de ani). Regiunea X transpusă este 99 % identică cu regiunea Xq21 a cromozomului X uman actual. Două gene sunt situate în această regiune , ambele având omologi pe cromozomul X.

Cercetările efectuate de Page și alții au relevat, de asemenea, că MSY conține secvențe numite palindromi - secvențe de perechi de baze în care aceleași informații pot fi citite în direcții opuse pe cele două catene complementare. Recombinarea palindromilor pe cromatidele surori ale cromozomului Y în timpul replicării este un mecanism utilizat pentru a repara mutațiile de pe cromozomul Y. Această

descoperire are implicații fascinante asupra modului în care cromozomul Y își menține dimensiunea și structura. La începutul anului 2010, Page și colegii săi au efectuat prima comparație cuprinzătoare a structurii cromozomului Y a două specii. O descoperire interesantă a fost că MSY al cromozomului Y uman este foarte diferit, în ceea ce privește structura sa secvențială, de MSY al cimpanzeilor. Studiul indică faptul că a avut loc o evoluție rapidă de la divergența acestor specii în urmă cu aproximativ șase milioane de ani - o surpriză, având în vedere că cromozomii sexuali ai primatelor există de sute de milioane de ani. Peste 30% din secvența MSY a cimpanzeilor nu are o secvență omoloagă în secvența MSY umană. MSY-ul cimpanzeului a pierdut multe gene care codificau proteine în comparație cu strămoșii săi comuni, dar conține de două ori mai multe secvențe palindromice decât MSY-ul uman.

A doua regiune a MSY este desemnată ca regiunea *X degenerată* . Cuprinzând aproximativ 20% din MSY, această regiune constă din secvențe de ADN care sunt și mai îndepărtate înrudite cu cele de pe cromozomul X. Regiunea X degenerată conține 27 de gene cu o singură copie, inclusiv numeroase *pseudogene* (gene ale căror secvențe au degenerat suficient în timpul evoluției pentru a le face nefuncționale). La fel ca în cazul genelor prezente în regiunea X transpusă, toate au o oarecare omologie cu omologii lor din cromozomul X. O astfel de genă este *SRY,* despre care am discutat anterior . Alte gene care codifică proteine din regiunea X degenerată sunt exprimate ubicuitar în toate țesuturile corpului, dar *SRY* este exprimată numai în testicule.

A treia regiune, *ampliconul,* care cuprinde aproximativ 30% din MSY (Maximum Syndrome - MSY), include majoritatea genelor strâns asociate cu dezvoltarea testiculară. Aceste gene nu au omologi pe cromozomul X, iar expresia lor este limitată la testicule. În această regiune, există 60 de unități de transcripție (gene care produc un produs specific) distribuite în nouă familii de gene, multe dintre ele fiind reprezentate prin copii multiple. Membrii fiecărei familii au secvențe de ADN aproape identice (>98%). Fiecare unitate repetată este un amplicon și este conținută în șapte segmente distribuite de-a lungul regiunilor eucromatice prezente atât pe brațul lung, cât și pe cel scurt al cromozomului Y. Genele din amplicon codifică proteine specifice pentru dezvoltarea și funcția testiculară, iar produsele multora dintre aceste gene sunt direct legate de fertilitatea masculină. În general, se crede că o mare parte din infertilitatea masculină din populație poate fi legată de mutații ale acestor gene. Această lucrare recentă a oferit o prezentare generală cuprinzătoare a informațiilor genetice prezente pe acest singur cromozom. Aceste informații infirmă în mod clar așa-numita *teorie a pustietății,* predominantă acum doar 20 de ani, care considera că cromozomul Y este aproape lipsit de informații genetice, cu excepția câtorva gene care conferă masculinitate. Cunoștințele pe care le-am dobândit oferă baza pentru o înțelegere mai clară a modului în care este determinată masculinitatea. În plus, aceste informații oferă indicii importante despre cum a apărut cromozomul Y în evoluția umană.

ACUM REZOLVĂ ASTA

7.2 Displazia campomelică (CDM1) este un sindrom congenital la om, care are ca rezultat malformații ale oaselor și cartilajelor. Este cauzată de o mutație autosomal dominantă a unei gene situate pe cromozomul 17. Luați în considerare următoarele observații în ordine *și, în fiecare caz, trageți* concluziile corespunzătoare .

(a) de acest sindrom și au cariotipic 46,XY, aproximativ 75% au sex inversat , prezentând o mare varietate de caracteristici feminine.

(b) Forma non-mutantă a genei, numită SOX9, este exprimată în gonadele în curs de dezvoltare ale masculilor XY, dar nu și la femelele XX .

(c) Gena *SOX9* are o omologie de 71% a secvenței codificatoare de aminoacizi cu gena *SRY* legată de Y.

(d) Pacienții cu CDM1 cu un cariotip 46,XX se dezvoltă ca femei , fără anomalii gonadice.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să aplicăm informațiile prezentate în acest capitol unui exemplu din viața reală . Cheia rezolvării acesteia constă în cunoașterea faptului că unele gene sunt activate și își produc produsul normal ca urmare a exprimării produselor altor gene situate pe cromozomi diferiți - în acest caz, poate una situată pe cromozomul Y.*

ESI

Raportul dintre bărbați și femei în specia umană nu este 1,0

■

Prezența cromozomilor sexuali heteromorfici la unul dintre sexele unei specii , dar nu la celălalt , oferă un posibil mecanism pentru producerea de urmași cu o proporție egală de masculi și femele. Acest potențial depinde de segregarea cromozomilor X și Y (sau Z și W) în timpul meiozei, astfel încât jumătate dintre gameții sexului heterogametic primesc un cromozom , iar cealaltă

jumătate îl primește pe celălalt. După cum am văzut în secțiunea anterioară , la oameni, există mici regiuni pseudoautosomale de împerechere omoloagă la ambele capete ale cromozomilor X și Y, ceea ce sugerează că cromozomii X și Y fac sinapsă și apoi se segregă în gameți diferiți. Cu condiția ca ambele tipuri de gameți să aibă același succes la fertilizare și ca ambele sexe să fie la fel de viabile în timpul dezvoltării fetale și embrionare, consecința ar trebui să fie urmași cu o proporție egală de masculi și femele.

Proporția reală de urmași de sex masculin și feminin, numită raport de sexe, a fost evaluată în două moduri. Raportul de sexe primar reflectă proporția de masculi și femele dintr-o populație la momentul concepției. Raportul de sexe secundar reflectă proporția de urmași născuți din fiecare sex. Raportul de sexe secundar este mult mai ușor de determinat, dar are dezavantajul că nu reflectă dezechilibrele dintre sexe în ceea ce privește mortalitatea embrionară sau fetală .

Când raportul de sexe secundar în populațiile umane a fost determinat în 1969 folosind datele recensământului mondial, s-a constatat că acesta nu era egal cu 1,0. De exemplu, în populația albă din Statele Unite , raportul de sexe secundar era puțin mai mic de 1,06, ceea ce indică faptul că s-au născut aproximativ 106 bărbați pentru fiecare 100 de femei. (Până în 1995, acest raport scăzuse ușor *la* puțin sub 1,05 .) În populația afro-americană din Statele Unite, raportul era de 1,025. În alte țări, excesul de nașteri de sex masculin este chiar mai mare decât reflectă aceste valori. De exemplu, în Coreea, raportul de sexe secundar era de 1,15 .

În ciuda acestor proporții, este posibil ca raportul de sexe primar să fie de 1,0 și să se modifice ulterior între concepție și naștere. Atunci, pentru un raport de sexe secundar care depășește 1,0, mortalitatea feminină prenatală ar fi mai mare decât mortalitatea masculină . Cu toate acestea, această ipoteză a fost examinată și s-a dovedit a fi falsă. De fapt, opusul este adevărat. Un studiu realizat de Institutul Carnegie, publicat în 1948, a determinat sexul a aproximativ 6.000 de embrioni și fetuși recuperați din avorturi spontane și induse, iar mortalitatea fetală a fost mai mare în rândul bărbaților. Pe baza datelor din acest studiu, raportul de sexe primar în populația albă din SUA a fost estimat la 1,079. Se crede acum că acest raport este mult mai mare - între 1,2 și 1,6 - sugerând că, în populațiile umane, sunt concepuți mult mai mulți bărbați decât femei.

Motivul unei abateri atât de semnificative de la raportul de sexe primar așteptat de 1,0 este neclar . Pentru a ajunge la o explicație adecvată, cercetătorii au trebuit să examineze ipotezele pe care se bazează raportul teoretic:

1. Din cauza segregării, masculii produc un număr egal de spermatozoizi cu cromozomi X și Y.
2. Fiecare tip de spermatozoid are viabilitate și motilitate echivalente în tractul reproducător feminin.
3. Suprafața ovulului este la fel de receptivă la spermatozoizii cu X sau cu Y.

Deși nu există dovezi experimentale directe care să contrazică niciuna dintre aceste presupuneri, cromozomul Y uman este mai mic decât cromozomul X și, prin urmare, are o masă mai mică. Astfel, s-a speculat că spermatozoizii purtători ai unui cromozom Y sunt mai mobili decât spermatozoizii purtători ai unui cromozom X. Dacă acest lucru este adevărat, atunci probabilitatea fertilizării care are ca rezultat un zigot masculin crește, oferind o posibilă explicație pentru raportul primar de sexe observat.

7,5

Compensarea dozei previne supraexprimarea genelor legate de X la mamifere

cromozomi X la femelele normale și a unui singur cromozom X la bărbații normali este un caz unic în comparație cu numărul egal de autozomi prezenți în celulele ambelor sexe. Se poate specula, doar teoretic , că această disparitate ar duce la o diferență în „dozajul genetic" între bărbați și femei, cu problemele pe care le implică - acest lucru pentru toate genele legate de X. Femelele au potențialul de a produce de două ori mai mult din fiecare produs al tuturor genelor legate de X. Se crede că cromozomii X suplimentari atât la bărbați, cât și la femei, care prezintă diversele sindroame menționate anterior în acest capitol, ar exacerba această problemă a dozajului. Dezvoltarea embrionară depinde de momentul potrivit și de reglarea precisă a nivelurilor de expresie genică . În caz contrar, pot apărea fenotipuri asociate bolilor sau poate apărea letalitate embrionară. În această secțiune vom descrie rezultatele cercetărilor privind expresia genelor legate de X, rezultate care demonstrează existența unui mecanism de compensare a dozajului genetic care echilibrează dozajul expresiei genelor cromozomului X atât la femei , cât și la bărbați.

Corpuri Barr

Experimentele realizate de Murray L. Barr și Ewart G. Bertram cu pisici femele, precum și studiile ulterioare efectuate de Keith Moore și Barr pe oameni, au demonstrat un mecanism genetic

la mamifere care compensează disparitatea dozajului cromozomului X. Barr și Bertram au observat un corp cu colorare închisă la culoare în celulele nervoase interfazice ale pisicilor femele, care nu a fost găsit în celule similare ale pisicilor masculi. La oameni , acest corp poate fi ușor demonstrat în celulele mucoasei bucale femele (celulele obrazului) sau în fibroblaste (celule ale țesutului conjunctiv nediferențiate), dar nu și în celule similare ale masculilor (Figura 7.8). Această structură foarte condensată, cu diametrul de aproximativ 1 µm, este atașată de anvelopa nucleară a celulelor interfazice. Se colorează pozitiv în reacția Feulgen , un test citochimic pentru ADN.

Dovezile experimentale actuale demonstrează că această structură, numită corpul cromatinei sexuale sau , pe scurt, corpul Barr, este un cromozom X inactivat . Susumu Ohno a fost primul care a sugerat că corpul Barr provine dintr-unul dintre cei doi cromozomi X. Această ipoteză este atractivă deoarece oferă un posibil mecanism de compensare a dozei. Dacă unul dintre cei doi cromozomi X este inactivat în celulele feminine, doza de informație genetică care poate fi exprimată la bărbați și femei va fi echivalentă. Dovezi indirecte, deși convingătoare, pentru această ipoteză provin din studiul sindroamelor cromozomiale sexuale descrise la începutul capitolului. Indiferent de numărul de cromozomi X pe care le posedă o celulă somatică , toți, cu excepția unuia, par a fi inactivați și pot fi observați ca și corpi Barr . De exemplu, în celulele somatice ale femeilor cu gena Turner 45,X, nu se observă niciun corp Barr; la bărbații cu gena Klinefelter 47,XXY, se observă doar unul; doi la femei cu gena 47, XXX; trei la femei cu gena 48,XXXX și așa mai departe (Figura 7.9). Prin urmare, numărul de corpi Barr urmează regula N - *1* , unde *N este* numărul total de cromozomi X prezenți.

Deși această aparentă inactivare a tuturor cromozomilor X, cu excepția unuia, ne sporește înțelegerea asupra

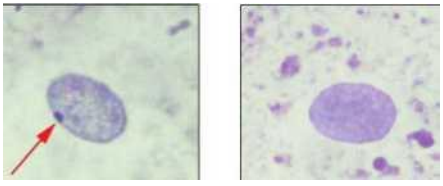


FIGURA 7.8 Microfotografii care compară nucleele celulelor epiteliale din gura unui bărbat, care nu au corpi Barr (dreapta), și de la o femeie, care au un corp Barr (indicat de o săgeată în imaginea din stânga). Această structură, numită și corp de cromatină sexuală, reprezintă un cromozom X inactivat.

FIGURA 7.9 Cazuri de corpi Barr în diverse cariotipuri umane, în care toți cromozomii X, cu excepția unuia *(N* - 1) sunt inactive.

Compensarea dozei complică percepția altor aspecte . De exemplu, din moment ce unul dintre cei doi cromozomi X este inactivat la femeile normale , de ce atunci indivizii cu cromozomul Turner 45,X nu sunt complet normali? De ce femeile cu cariotipuri triplu X și tetra X (47, XXX și 48,XXXX) sunt afectate de cromozomii X suplimentari ? Mai mult, în sindromul Klinefelter (47,XXY), inactivarea unui cromozom X face ca persoana să fie practic 46>XY. Așadar, de ce sunt acești indivizi afectați de prezența unui cromozom X suplimentar în nucleul lor ?

O posibilă explicație este că inactivarea cromozomilor nu are loc în mod normal în stadiile incipiente ale dezvoltării celulelor destinate formării țesutului gonadal. O altă posibilă explicație este că nu tot cromozomul X care formează corpul Barr este inactivat. Studii recente au arătat, de fapt, că până la 15 % dintre genele de pe cromozomul X la oameni scapă inactivării . Prin urmare , este clar că nu toate genele de pe cromozomul X trebuie inactivate. În ambele cazuri , exprimarea excesivă a anumitor gene legate de X ar putea apărea în continuare în anumite momente critice de dezvoltare , în ciuda inactivării aparente a cromozomilor X superflui.

Ipoteza Lyon

La mamiferele femele , un cromozom X este de origine paternă ,

iar celălalt de origine maternă. Care este inactivat? Inactivarea are loc aleatoriu? Este același cromozom inactivat în toate celulele somatice? În 1961, Mary Lyon și Liane Russell au propus independent o ipoteză care răspundea la aceste întrebări. Ele au postulat că inactivarea cromozomului X are loc aleatoriu în celulele somatice într-un stadiu incipient al dezvoltării embrionare , probabil în timpul stadiului de blastocist. Odată ce a avut loc inactivarea, toate celulele descendente au același cromozom X inactivat ca și celula lor părinte.

Această explicație, care a ajuns să fie numită ipoteza Lyon, s-a bazat inițial pe observarea șoarecilor femele heterozigote pentru genele de culoare a blănii legate de X. Pigmentarea acestor femele heterozigote era pestriță, cu pete mari care exprimă alela de culoare a unui cromozom X și alte pete care exprimă alela celuilalt cromozom X. Într-adevăr, un astfel de model fenotipic ar rezulta dacă diferiți cromozomi X ar fi inactivi în celulele petelor adiacente. Modele mozaicate similare apar în petele negre și galben-portocaliu ale pisicilor carapace de broască țestoasă și calico (Figura 7.10). Astfel de modele de culoare a blănii legate de X nu apar la pisicile masculi, deoarece toate celulele lor au un singur cromozom X matern și, prin urmare, sunt hemizigote pentru o singură alelă de culoare a blănii legată de X.

Cea mai directă dovadă care susține ipoteza lui Lyon provine din studiile de expresie genică în clone de fibroblaste umane. După biopsie și cultură *in vitro* , celulele individuale pot fi izolate. Dacă fiecare cultură este derivată dintr -o singură celulă, aceasta se numește clonă. Sinteza enzimei glucozo-6-fosfat dehidrogenază (G6PD) este controlată de o genă legată de cromozomul X. Numeroase alele mutante ale acestei gene au fost detectate , iar produsele lor genetice pot fi distinse de enzima de tip sălbatic prin modelele lor de migrare într-un câmp electroforetic.

Au fost prelevate fibroblaste de la femei heterozigote și studiate pentru diferite forme alelice de G6PD . Ipoteza Lyon prezice că, dacă inactivarea unui cromozom X are loc aleatoriu în stadiile incipiente ale dezvoltării și ulterior toate celulele descendente au același cromozom X inactivat ca și progenitorul lor, aceste femei vor prezenta două tipuri de clone, în proporții aproximativ egale, fiecare prezentând o singură formă electroforetică de *G6PD*.

În 1963, Ronald Davidson și colegii săi au efectuat un experiment cu 14 clone ale unei femei heterozigote. Șapte posedau o singură formă a enzimei, iar celelalte șapte posedau doar cealaltă formă. Cel mai important, niciuna dintre cele 14 clone nu poseda ambele forme ale enzimei. Astfel, studiul mutanților *G6PD* a oferit un sprijin semnificativ pentru inactivarea aleatorie și permanentă a unui cromozom X matern sau patern .

Ipoteza lui Lyon este în general acceptată ca fiind validă; de fapt, inactivarea unui cromozom X în corpul Barr este uneori numită lyonizare. O extindere largă a ipotezei este că mamiferele femele sunt mozaicuri pentru toate genele heterozigote legate de X - unele zone ale corpului exprimă doar alele derivate de la mamă , iar altele de la tată. Un exemplu deosebit de interesant este daltonismul roșu -verde, o tulburare recesivă legată de X. La om , masculii hemizigoți sunt complet daltoniști în toate celulele retinei . Cu toate acestea , femelele heterozigote au retine mozaic, cu zone de percepție defectuoasă a culorilor înconjurate de zone de percepție normală a culorilor. În acest exemplu , inactivarea aleatorie a unuia dintre cei doi cromozomi X la începutul dezvoltării la femelele heterozigote are ca rezultat aceste fenotipuri.

(a)

(b)

FIGURA 7.10 (a) Una gata calicó, en donde la distribución aleatoria de las manchas naranja y negras ilustra la hipótesis de Lyon. Las áreas blancas se deben a otro gen. (b) Una gata carey, que no tiene las manchas blancas que caracterizan a las calicós.

ACUM REZOLVĂ ASTA

7.3. CC (Carbon Copy), prima pisică clonată, a provenit dintr -o celulă ovariană prelevată de la donatorul său genetic Rainbow, o pisică calico. Nucleul diploid a fost îndepărtat din celulă și introdus într-un ou enucleat. Zigotul rezultat a fost apoi lăsat să se dezvolte într-o placă Petri , iar embrionul clonat a fost implantat în uterul unei pisici mamă surogat, care a născut-o pe CC . Mama surogat a lui CC a fost o pisică tigrată *(vezi* fotografia de la pagina 213 la sfârșitul capitolului). Geneticienii erau foarte interesați de rezultatul clonării unei pisici calico, deoarece nu erau siguri dacă pisica va avea marcaje portocalii și negre, doar portocalii sau doar negre. Având în vedere ipoteza lui Lyon , explicați motivul incertitudinii lor . V-ați aștepta ca CC să arate identic cu Rainbow? Explicați de ce da sau de ce nu .

- **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea ipotezei Lyon. Cheia rezolvării ei este să realizăm că nucleul donator provine dintr-o celulă ovariană diferențiată a unei pisici adulte , care avea unul dintre cromozomii X inactivați.*

Mecanismul de inactivare

Cel mai puțin înțeles aspect al ipotezei lui Lyon este mecanismul prin care are loc inactivarea cromozomului X. Într-un fel, fie ADN-ul, fie proteinele histone asociate, fie ambele sunt modificate chimic, reducând la tăcere majoritatea genelor de pe acel cromozom. Odată reduse la tăcere, se creează o memorie care menține același omolog inactivat după replicarea cromozomilor și diviziunea celulară . Acest proces, în care expresia genelor este afectată la un omolog, dar nu și la celălalt, se numește imprimare genetică (imprinting). Acest termen este aplicat și altor cazuri în care informația genetică este modificată, iar expresia genelor este reprimată. Colectiv , aceste evenimente fac parte din domeniul în creștere al epigeneticii *(vezi* Capitolul 26).

Cercetările actuale încep să clarifice mecanismul de inactivare. Principala unitate de control este o regiune a cromozomului X la mamifere. Această regiune, situată la capătul proximal al brațului p la om, se numește *centrul* de inactivare X (Xic), iar expresia sa genică *are loc numai pe cromozomul X inactivat.* Xic are o lungime de aproximativ 1 Mb (10^6 perechi de baze) și se știe că conține mai multe unități de reglare presupuse și patru gene. Acum știm că una dintre acestea, *transcriptul specific inactiv X (XIST),* Este o genă critică pentru inactivarea X.

Au fost făcute mai multe observații interesante cu privire la ARN-ul transcris din *gena XIST,* multe dintre ele datorită experimentelor care au utilizat gena echivalentă de șoarece (Xist). În primul rând , produsul ARN este destul de mare și nu codifică o proteină , deci nu este tradus. Produșii ARN *Xist* difuzează și acoperă cromozomul X *care conține gena care i-a produs* . De asemenea *, se* crede că alte două gene necodificatoare la locusul Xic *, Tsix* (un complement antisens al Xist *),* și *Xite* , joacă roluri importante în inactivarea X.

O a doua observație este că transcripția Xist are loc inițial la un nivel scăzut pe toți cromozomii X. *Cu toate acestea* , pe măsură ce procesul de inactivare începe , transcripția continuă și este amplificată doar pe cromozomul X care devine inactiv. În 1996, un grup de cercetare condus de Neil Brockdorff și Graeme Penny a furnizat dovezi convingătoare că transcripția *Xist* Acesta este evenimentul critic în inactivarea cromozomilor. Acești cercetători au reușit să inducă o deleție țintită (7 kb) în această genă, perturbându-i secvența . Drept urmare , cromozomul care suferise deleția și - a pierdut capacitatea de a fi inactivat. Rămân deschise câteva întrebări interesante privind imprimarea și inactivarea . De exemplu, în celulele cu mai mult de doi cromozomi X, ce fel de mecanism de „numărare" există care determină inactivarea tuturor cromozomilor X, cu excepția unuia ? Studiile realizate de Jeannie T. Lee și colegii săi sugerează că cromozomii X materni și paterni trebuie mai întâi să se împerecheze și să se alinieze pentru scurt timp la locusurile lor Xic . ca mecanism de renumărare a numărului de cromozomi X, înainte de inactivarea X [Figura 7.11(a)]. Folosind celule stem embrionare de șoarece , grupul lui Lee a efectuat o deleție a genei *Tsix* conținută în *locusul Xic.* Această deleție a blocat împerecherea XX și a dus la inactivarea haotică a 0, 1 sau 2 cromozomi X [Figura 7.11(b)]. Lee și colegii săi au furnizat dovezi suplimentare pentru rolul locusului *Xic* în numărarea cromozomilor prin adăugarea de copii ale cromozomilor non-X modificați genetic, care conțin copii multiple de Tsix *sau Xite* . (Aceste copii sunt numite transgene deoarece sunt introduse artificial în organism .) Această procedură experimentală a blocat eficient împerecherea XX și a prevenit inactivarea cromozomului X [Figura 7.11 (c)] .

gene și produse proteice sunt , de asemenea , examinate pentru a clarifica rolul lor în împerecherea și numărarea cromozomilor X. Studii recente realizate de Lee și colegii săi au furnizat dovezi că cromozomul X inactivat trebuie să fie asociat cu regiuni situate la periferia nucleului pentru a menține o stare de expresie genică silențioasă. De fapt, în majoritatea celulelor somatice ale femeilor, cromozomul X inactivat este observat asociat cu anvelopa nucleară sub formă de corpi Barn .

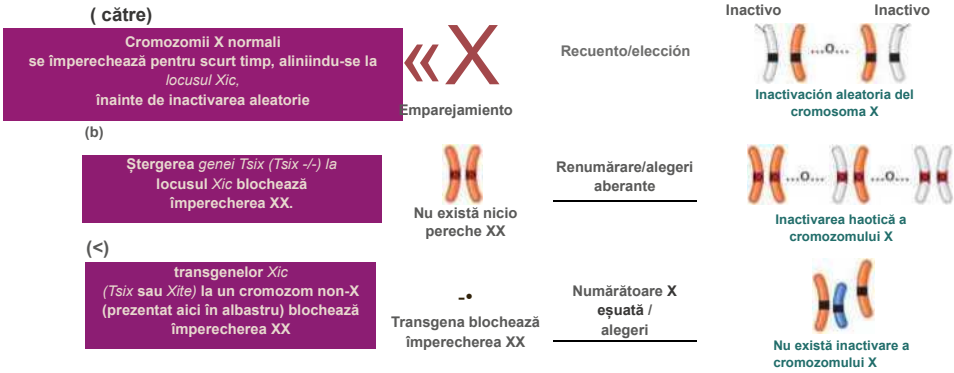


FIGURA 7.11 (a) Împerecherea tranzitorie a cromozomilor X poate fi necesară pentru a iniția inactivarea X.
(b) Ștergerea genei *Tsix din* locusul *Xic previne împerecherea XX și duce la* inactivarea haotică a genei X , (c) Blocarea împerecherii XX prin adăugarea de transgene care conțin *Xic* blochează împerecherea XX și previne inactivarea genei X.

Multe întrebări rămân. Ce „blochează" locusul *Xic* de pe cromozomul activ, împiedicând transcrierea ulterioară a lui *Xist?* Cum creează imprimarea o „memorie" astfel încât inactivarea aceluiași cromozom X, sau a acelorași cromozomi X, să fie menținută ulterior în celulele descendente, așa cum propune ipoteza lui Lyon? Indiferent de răspunsurile la aceste întrebări, oamenii de știință au făcut o serie de pași importanți pentru a înțelege cum are loc compensarea dozei la mamifere .

Proporția cromozomilor X în raport cu numărul de autozomi determină sexul la *Drosophila*

Întrucât masculii și femelele *de Drosophila melanogaster* (și alte *specii de Drosophila)* au aceeași compoziție de cromozomi sexuali ca și oamenii (masculii sunt XY, iar femelele sunt XX), am putea presupune că și cromozomul Y dă naștere la masculinitate la aceste musculițe. Cu toate acestea, eleganta lucrare a lui Calvin Bridges din 1916 a demonstrat că nu este cazul. El a studiat musculițe cu complemente cromozomiale variate și a concluzionat că la acest organism cromozomul Y nu este implicat în determinarea sexului. Dimpotrivă, Bridges a propus că atât cromozomul X, cât și autozomii joacă un rol decisiv în determinarea sexului. Reamintim că la nematodul *C. elegans,* La indivizii cărora le lipsește - cromozomul Y, cromozomii sexuali și autozomii sunt, de asemenea, cruciali în determinarea sexului .

Munca lui Bridges poate fi împărțită în două faze: (1) un studiu al urmașilor rezultați din nedisjuncția cromozomilor X în timpul meiozei la femele și (2) studii ulterioare cu urmașii femelelor care au trei copii ale fiecărui cromozom, numiți femele triploide (3n). După cum am văzut anterior în acest capitol (și așa cum se arată în Figura 8.1), nedisjuncția este eșecul cromozomilor perechi de a segrega sau separa în anafaza primei sau a doua diviziuni meiotice. Rezultatul este producerea a două tipuri de gameți anormali, dintre care unul are un cromozom suplimentar (n + 1), iar celuilalt îi lipsește un cromozom (n - 1). Fertilizarea unor astfel de gameți aberanți de către gameți haploizi are ca rezultat *2n* + 1 sau 2n - *1* zigoți . 1. Ca și la oameni , dacă non-disjuncția implică cromozomul X, rezultatul poate fi o compoziție atât a cromozomilor sexuali XXY, cât și a celor X0, pe lângă complementul normal de autozomi. („0" înseamnă că nu există nici un al doilea cromozom X, nici un cromozom Y, așa cum se întâmplă în genotipurile X0 ale indivizilor cu sindrom Turner.)

Contrar a ceea ce s-a descoperit ulterior la oameni, Bridges a descoperit că mușteleXXY erau femele normale, iar mușteleX0 erau masculi sterili. Prezența unui cromozom Y la mușteleXXY nu a dus la masculinitate , iar absența sa la mușteleX0 nu a produs feminitate. Din aceste date, el a concluzionat că cromozomul Y din *Drosophila* nu are factori care determină

masculinitatea, dar, deoarece masculii X0 erau sterili, acesta conținea informații genetice esențiale pentru fertilitatea masculină . Cercetări recente au arătat că cromozomul Y din *Drosophila* conține doar aproximativ 20 de gene care codifică proteine , dar că mutațiile acestor gene au un impact semnificativ asupra reglării expresiei a sute de gene situate pe alți cromozomi , inclusiv gene aparținând cromozomului X.

Bridges a reușit să clarifice modul de determinare a sexului la *Drosophila* studiind urmașii femelelor triploide (3s), care au trei copii ale fiecărui set haploid de cromozomi. *Drosophila* are un număr haploid de 4, posedând trei perechi de autozomi pe lângă perechea sa de cromozomi sexuali. Femelele triploide provin aparent din ovule diploide rare fertilizate de un spermatozoid haploid normal. Femelele triploide aveau corpuri mai plinuțe, ochi și peri mai aspri și puteau fi fertile. Datorită numărului impar al fiecărui cromozom (3), meioza produce gameți cu o mare varietate de complemente cromozomiale, rezultând urmași cu o mare varietate de seturi de cromozomi anormale. Corelația dintre - morfologia sexuală și constituția cromozomilor, împreună cu interpretarea lui Bridges , este prezentată în Figura 7.12.

Bridges a descoperit că factorul critic în determinarea sexului este *raportul dintre cromozomii X și numărul de seturi autozomale haploide (A) prezente.* Femelele normale (2X:2A) și triploide (3X:3A) au un raport de 1,0 și ambele sunt fertile. Când raportul depășește 1 (de exemplu, 3X:2A sau 1,5), *se produce ceea ce inițial se numea superfemelă.* Deoarece aceste femele sunt adesea inviabile, acum sunt numite mai precis metafemelă.

Masculii normali (XY:2A) și sterili (Xü:2A) au un raport de 1:2, sau 0,5. Când raportul scade la 1:3, sau 0,33, ca în cazul unui mascul XY:3A, se produc metamasculi sterili . Alte muște recuperate de Bridges în aceste studii au avut un raport X:A intermediar, între 0,5 și 1,0. Aceste muște erau de obicei mai mari și prezentau o serie de anomalii morfologice, precum și gonade și organe genitale bisexuale rudimentare . Erau invariabil sterile și exprimau atât caracteristici morfologice masculine, cât și feminine și, prin urmare, erau denumite intersex.

Rezultatele lui Bridges indică faptul că, la **Drosophila*,* factorii care determină dezvoltarea unei musculițe ca mascul nu sunt localizați pe cromozomii sexuali, ci mai degrabă pe autozomi. Cu toate acestea, unii factori care determină femelele sunt localizați pe cromozomii X. Astfel, în ceea ce privește determinarea primară a sexului, gameții masculini care conțin fiecare dintre autozomi plus un cromozom Y dau naștere la urmași masculi, nu datorită prezenței cromozomului Y, ci absenței cromozomului X. Acest tip de - determinare a sexului este explicat prin teoria echilibrului genetic. Bridges a propus că un anumit prag pentru masculinitate este atins atunci când raportul X:A este 1:2 (X:2A), dar prezența unui cromozom X suplimentar (XX:2A) modifică echilibrul și duce la diferențierea femelelor.

implicate în determinarea sexului la *Drosophila* au fost identificate . Mutațiile recesive ale genei transformatoare autosomale (ira), descoperite în urmă cu mai bine de 75 de ani de Alfred H. Sturtevant , demonstrează clar că o singură genă autosomală poate avea un impact profund asupra determinării sexului . Femelele homozigote pentru *transfomarea autosomală* se transformă

Macho diploide normal

2 dotaciones de autosomas
+
X Y

Fórmula cromosómica	Proporción de cromosomas X respecto de dotaciones autonómicas	Morfología sexual
3X/2A	1,5	Metahembra
^{3X}/3A	LO	Hembra
^{2X}/2A	LO	Hembra
^{3X}/4A	0,75	Intersexo
^{2X}/IA	0,67	Intersexo
^{x}/zA	0,50	Macho
^{X*}/2A	0,50	Macho
^{XY}/3A	0,33	Metamacho

FIGURA 7-12 Composiciones cromosómicas, las proporciones correspondientes de cromosomas X con respecto a las dotaciones de autosomas y la morfología sexual resultante en *Drosophila tnekinoglister.* La composición cromosómica diploide normal en los machos se muestra como referencia a la izquierda (XY/2A). Las filas que representan a hembras y machos de características normales sa muestran ligeramente sombreadas.

în masculi sterili, în timp ce masculii homozigoți nu sunt afectați.

s-a demonstrat că o altă genă, *gena sex-lethal (Sxl),* joacă un rol esențial, servind ca un „întrerupător principal" în determinarea sexului. Activarea genei *Sxl legate de cromozomul X* , care depinde de un raport X-autozom de 1,0, este esențială pentru dezvoltarea feminină. În absența activării - de exemplu, când raportul X:A este 0,5 - are loc dezvoltarea masculină. Interesant este că mutațiile care inactivează *gena Sxl,* așa cum au fost studiate inițial în 1960 de Hermann J. Mullen, ucid embrionii feminini, dar nu au niciun efect asupra embrionilor masculini, ceea ce este în concordanță cu rolul descris al genei. Deși nu este încă pe deplin clar cum influențează acest raport *locusul Sxl,* au apărut câteva idei. Locusul *Sxl* face parte dintr-o ierarhie a expresiei genelor și exercită control asupra altor gene, inclusiv gena *tra* (discutată în paragraful anterior) și *dsx (doublesex).* Doar la femele este activată alela de tip sălbatic a *genei tra* de produsul Sxl , care la rândul său influențează expresia genei *dsx.*

În funcție de modul în care este procesată transcrierea inițială de ARN (în funcție de modul în care este îmbinată, așa cum se explică mai târziu), proteina *dsx rezultată* activează gene specifice masculine sau feminine necesare pentru diferențierea sexuală. Fiecare etapă din această cascadă de reglare necesită o formă de procesare numită îmbinare a ARN-ului, prin care părți ale ARN-ului sunt îndepărtate, iar fragmentele rămase sunt îmbinate înainte de translația în proteine. În cazul *genei Sxl,* transcrierea de ARN poate fi îmbinată în moduri diferite, un fenomen numit îmbinare alternativă . La femele se produce o transcriere de ARN diferită față de masculi. La potențialele femele, transcrierea codifică o proteină nefuncțională și inițiază o cascadă de expresie genică reglatoare, ducând în cele din urmă la diferențierea feminină. La potențialii masculi , transcrierea codifică o proteină nefuncțională, ducând la un model diferit de activitate genică și rezultând în diferențierea masculină. Vom reveni la acest subiect în Capitolul 17, când vom reconsidera îmbinarea alternativă ca unul dintre mecanismele implicate în reglarea expresiei genelor la eucariote.

Compensarea dozei la *Drosophila*

Întrucât femelele *de Drosophila* au două copii ale genelor legate de cromozomul X, în timp ce masculii au doar una, există o problemă de compensare a dozei, similară cu cea observată la mamifere, cum ar fi oamenii și șoarecii. Cu toate acestea, mecanismul de compensare a dozei la Drosophila *diferă* considerabil de cel al mamiferelor, deoarece nu se observă inactivarea cromozomului X. În schimb, la masculi, genele legate de cromozomul X sunt transcrise cu o rată dublă față de femele. Interesant este că, dacă grupuri de gene legate de cromozomul X sunt translocate în autozomi, compensarea dozei îi afectează și pe aceștia, chiar dacă nu mai fac parte din cromozomul X.

Ca și în cazul mamiferelor, recent s- au înregistrat progrese considerabile în înțelegerea procesului de compensare a dozei la *Drosophila.* Se cunosc cel puțin patru gene autozomale implicate, toate controlate de aceeași genă principală *Sxl* care induce diferențierea feminină în determinarea sexului. Mutațiile în oricare dintre aceste gene reduc drastic expresia crescută a genelor legate de cromozomul X la masculi, rezultând letalitate.

În prezent, există dovezi care susțin un mecanism de creștere a activității genelor la masculi. Cel mai larg acceptat model propune că una dintre genele autozomale , *mie (fără mascul),* codifică o proteină care se leagă la numeroase situsuri de-a lungul cromozomului X, ducând la o creștere a expresiei genelor. Produșii celorlalte trei gene autozomale participă și sunt necesari pentru *legarea mie. În plus,* s-a demonstrat că proteinele numite *proteine letale specifice masculilor* (MSL) se asociază cu regiuni bogate în gene ale cromozomului X pentru a crește expresia genelor la musculițele masculi. Colectiv, acest set de proteine activatoare de gene se numește complex de compensare a dozei (DCC). Figura 7.13 ilustrează prezența acestor proteine asociate cu X la *Drosophila,* în contrast cu...

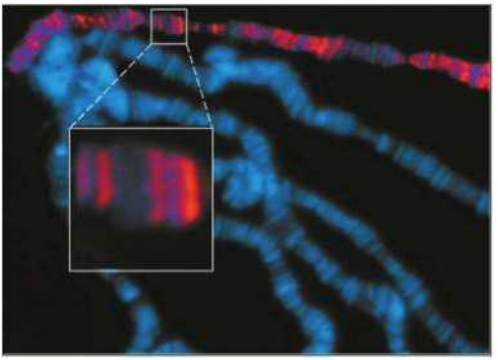


FIGURA 7.13 Anticorpii fluorescenți împotriva proteinelor complexului de compensare a dozei (DCC) sunt asociați doar cu cromozomul X în preparatele de cromozomi politeni Drosophila , *oferind* dovezi privind rolul DCC în amplificarea expresiei genelor legate de X.

incapacitatea de a se asocia cu autozomii. Localizarea proteinelor DCC poate fi identificată atunci când anticorpii fluorescenți împotriva acestor proteine sunt adăugați la preparatele - cromozomilor mari politeni, caracteristici celulelor glandelor salivare din larvele de muscă *(vezi* Capitolul 12).

Acest model prezice că gena principală *Sxl* joacă un rol crucial în compensarea dozei. La musculițele XY, *Sxl* este inactivă; prin urmare, genele autozomale sunt activate, ceea ce duce la o activitate crescută a cromozomului X. În schimb, *Sxl* este activ la femelele XX și acționează prin inactivarea uneia sau mai multor gene autozomale specifice masculilor, poate chiar *MIE.* Prin reducerea activității acestor gene autozomale, se asigură că acestea nu vor acționa pentru a dubla expresia genelor legate de X la femele, ceea ce ar exacerba problema dozei.

Tom Cline a propus că, înainte de activarea mecanismului de compensare a dozei menționat anterior, *Sxl* acționează ca un senzor pentru exprimarea altor gene legate de cromozomii X. Într -un fel, *Sxl* numără cromozomii X. De exemplu , atunci când înregistrează o doză mare a expresiei sale, ca o consecință a prezenței a doi cromozomi X, produsul genei *Sxl* este modificat , reducând exprimarea genelor autozomale. Deși acest model poate fi încă modificat sau redefini, este util ca ghid pentru cercetările viitoare.

La *Drosophila* (și probabil la multe organisme înrudite), există în mod clar un mecanism de compensare a dozei complet diferit de cel al mamiferelor. Dezvoltarea unui mecanism complex pentru egalizarea expresiei genelor legate de X demonstrează importanța esențială a nivelului de expresie genică. Un echilibru delicat al produselor genetice este necesar pentru a menține dezvoltarea normală la masculi și femele.

Mozaicuri în *Drosophila*

Cunoștințele noastre despre determinarea sexului și legătura X la *Drosophila* (Capitolul 4) ne ajută să înțelegem apariția rară a unei musculițe de fructe excepționale, prezentată în Figura 7.14. Această muscă a fost recuperată dintr-o tulpină în care toate celelalte femele erau heterozigote pentru genele legate de X *eyes *while* * *(w) și* **miniature* wings * (m). Este o ginandromorfă bilaterală, ceea ce înseamnă că o jumătate a corpului său (jumătatea stângă) s-a dezvoltat ca mascul, iar cealaltă jumătate (jumătatea dreaptă) ca femelă.

Putem explica prezența ambelor sexe la o singură muscă după cum urmează. Dacă un zigot femelă (heterozigot pentru ochi *albi* și *aripi miniaturale)* ar pierde unul dintre cromozomii X în prima diviziune mitotică, cele două celule rezultate ar avea constituțiile XX și respectiv X0 . Astfel, o celulă ar fi femelă, iar cealaltă masculină. Fiecare dintre aceste celule este responsabilă pentru producerea tuturor celulelor fiice care vor constitui fie partea dreaptă, fie...

FIGURA 7.14 Un ginandromorf bilateral de *Drosophila melanogaster* format după pierderea unui cromozom X într-una dintre cele două celule ale primei diviziuni mitotice. Partea stângă a muscii , compusă din celule masculine cu un singur cromozom X , exprimă alelele mutante ochi *albi* și aripi miniaturale . Partea dreaptă este formată din celule feminine care conțin doi cromozomi X heterozigoți pentru cele două alele recesive.

ei bine , partea stângă a organismului în embriogeneză .

În cazul ginandromorfului bilateral, celula X0 originală a produs aparent doar celule fiice identice și a dat naștere jumătății stângi a muscii, care, datorită compoziției sale cromozomiale, era masculină. Deoarece jumătatea masculină prezintă fenotipul *alb, miniaturizat ,* cromozomul X care poartă alelele >v 'ym' a fost pierdut, în timp ce omologul care poartă wy ni a fost păstrat. Toate celulele din partea dreaptă a corpului au fost derivate din celula XX originală, rezultând dezvoltarea femelei. Aceste celule, care au rămas heterozigote pentru ambele gene mutante, au exprimat fenotipurile de ochi și aripi de tip sălbatic.

În funcție de orientarea fusului în prima diviziune mitotică, se pot produce ginandromorfe care au „linia" de demarcație dintre dezvoltarea masculină și cea feminină de-a lungul oricăreia dintre axele corpului muscii.

Variația temperaturii reglează determinarea sexului la reptile

Încheiem acest capitol abordând câteva cazuri care implică reptile , în care mediul, în special temperatura , are o influență semnificativă asupra determinării sexului . Spre deosebire de determinarea genotipică a sexului (GSD), în care sexul este determinat genetic (ca în toate exemplele prezentate până acum în acest capitol), cazurile pe care le vom examina acum sunt clasificate ca determinare a sexului dependentă de temperatură (TSD). După cum vom vedea ,

cercetarea care a condus la aceste informații poate fi mai aproape de dezvăluirea adevăratei naturi a bazei primare a determinării sexului decât oricare dintre descoperirile prezentate anterior.

La multe specii de reptile, determinarea genotipică a sexului are loc în timpul concepției, pe baza compoziției cromozomilor sexuali, așa cum este cazul multor organisme deja luate în considerare în acest capitol. De exemplu, la mulți șerpi, cum ar fi viperele, configurația ZZ/ZW este normală , femela având sexul heterozigot (ZW). Cu toate acestea, la boa și pitoni, este imposibil să se distingă un cromozom sexual de oricare altul la oricare dintre sexe. La șopârle, se găsesc ambele sisteme, XX/XY și ZZ/ZW, în funcție de specie.

Cu toate acestea, la alte specii de reptile, determinarea sexului dependentă de temperatură este norma, incluzând toți crocodilii, majoritatea țestoaselor și unele șopârle , unde determinarea sexului se realizează în funcție de temperatura de incubare a ouălor în timpul unei perioade critice în dezvoltarea embrionară. Există trei modele distincte de determinare a sexului dependentă de temperatură (cazurile I-III din Figura 7.15). În cazul I, temperaturile scăzute produc 100% femele, în timp ce temperaturile ridicate produc 100% masculi. Exact opusul se întâmplă în cazul II. În cazul III, atât temperaturile ridicate, cât și cele scăzute au ca rezultat 100 % femele , în timp ce temperaturile intermediare produc proporții variabile de masculi. Al treilea model este observat la mai multe specii de - crocodili, țestoase și șopârle, deși se știe că alți membri ai acestor grupuri prezintă celelalte modele.

Două observații importante trebuie făcute. În primul rând, în toate cele trei modele, atât puii masculi, cât și cei femele sunt produși la anumite temperaturi. În al doilea rând, acest interval critic de temperatură *(T_P)* este destul de îngust, cuprinzând de obicei mai puțin de 5 °C și uneori doar 1 ° C . Întrebarea centrală care se ridică din aceste observații este: ce parametri metabolici și fiziologici care duc la diferențierea sexuală sunt afectați de temperatură?

Se crede că răspunsul implică steroizii (în principal estrogenii) și enzimele implicate în sinteza lor. Studiile au demonstrat clar că efectele temperaturii asupra estrogenilor , androgenilor și inhibitorilor enzimelor care controlează sinteza acestora sunt implicate în diferențierea sexuală a ovarelor și testiculelor. O enzimă în special, aromataza, transformă androgenii (hormoni masculini precum testosteronul) în estrogeni (hormoni feminini precum estradiolul). Activitatea acestei enzime este corelată cu calea reacțiilor care au loc în timpul diferențierii gonadale și este ridicată în timpul dezvoltării ovariene și scăzută în timpul dezvoltării testiculare . Cercetătorii din acest domeniu, cum ar fi Claude Pieau și colegii săi , au propus că un factor termosensibil intervine în transcripția genei aromatazei reptiliene , rezultând o determinare a sexului dependentă de temperatură . Alte gene sunt probabil implicate în acest proces .

Implicarea steroizilor sexuali în diferențierea gonadică a fost documentată și la păsări, pești și amfibieni. Astfel, mecanismele de determinare a sexului care implică estrogeni par a fi caracteristice vertebratelor non- mamifere . Reglarea unui astfel de sistem, deși dependentă de temperatură la multe reptile , pare a fi controlată de cromozomii sexuali (XX/XY sau ZZ/ ZW) la multe dintre aceste alte organisme. Un ultim punct interesant în această privință este că produsul genei SRY , o componentă cheie în *determinarea* sexului la mamifere , s -a dovedit a se lega in vitro de o *regiune* reglatoare *a* genei aromatazei , sugerând un mecanism prin care

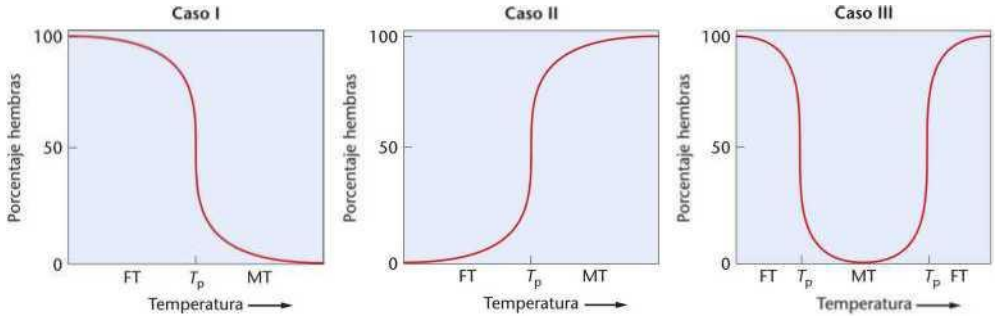


FIGURA 7.1 Trei modele distincte de determinare a sexului dependentă de temperatură (TSD) la reptile, așa cum sunt descrise în text. Temperatura critică relativă *Tp* este crucială pentru determinarea sexului într-un moment critic al dezvoltării embrionare (FT — Temperatura de determinare a femelei; MT — Temperatura de determinare a masculului).

O chestiune de gen: selecția sexului la oameni

J \ De- a lungul istoriei , oamenii au încercat să influențeze sexul copiilor lor . născuți prin metode diverse și uneori bizare. În Europa medievală, viitorii părinți plasau un ciocan sub pat pentru a-i ajuta să conceapă un băiat sau o foarfecă pentru a concepe o fată. Alte practici se bazau pe credințe străvechi conform cărora sperma din testicului drept producea urmași de sex masculin , iar cea din testicului stâng producea urmași de sex feminin. Până în secolul al XVIII-lea, europenii își legau sau își îndepărtau testicului stâng pentru a crește probabilitatea de a avea un moștenitor de sex masculin. În unele culturi , eforturile de a controla sexul copiilor au o latură întunecată - pruncuciderea feminină . În Grecia antică , uciderea bebelușilor de sex feminin era atât de frecventă încât raportul bărbați-femei în unele zone se apropia de 4:1. S -a raportat că, în unele zone din India rurală, sute de familii au recunoscut practica pruncuciderii nou-născuților , chiar și în anii 1990. În 1997, Organizația Mondială a Sănătății a publicat date demografice care arată că aproape 50 de milioane de femei „ dispăruseră ” în China, probabil din cauza avortului selectiv al fetușilor de sex feminin și a neglijării instituționalizate a celor care reușesc să se nască.

În ultima vreme, avorturile selective în funcție de sex au înlocuit în mare măsură infanticidul feminin tradițional. Unele companii oferă comercial amniocenteză și teste cu ultrasunete pentru determinarea sexului prenatal . Studiile din India estimează că sute de mii de fetuși sunt avortați în fiecare an deoarece sunt de sex feminin . Ca o consecință a avortului selectiv în funcție de sex , raportul femei - bărbați în India a fost de 927 :1.000 în 1991. În unele state nordice, raportul a fost de doar 600:1.000.

În țările industrializate occidentale , progresele în tehnologia genetică și reproductivă oferă părinților modalități de a selecta sexul copiilor lor înainte ca embrionul să fie implantat în uter - o tehnică numită *selecție genetică* preimplantatorie (PGS). După fertilizarea *in vitro ,* se poate efectua o biopsie pe embrioni pentru a le determina sexul. Doar embrionii de sexul selectat vor fi apoi implantați . Cea mai simplă metodă de selecție a sexului implică separarea spermatozoizilor care poartă un cromozom X de cei care poartă un cromozom Y , pe baza conținutului lor de ADN. Datorită dimensiunilor diferite ale cromozomilor X și Y , spermatozoizii care poartă cromozomul X au cu 2,8-3,0 % mai mult ADN decât spermatozoizii care poartă cromozomul Y. Probele de sperm ă sunt colorate cu un colorant fluorescent pentru ADN , apoi trecute printr -un fascicul laser într-un sortator de celule *activat prin* fluorescență (FACS *),* care separă spermatozoizii în două porțiuni pe baza intensității fluorescenței ADN -ului. Spermatozoizii astfel sortați sunt apoi utilizați - pentru inseminarea intrauterină normală .

Metodele PGS emergente ridică o serie de probleme etice și juridice . Unii oameni consideră că potențialii părinți au dreptul legal de a utiliza tehnici de selecție a sexului ca parte a libertății lor reproductive fundamentale . Susținătorii susțin că tehnicile PGS vor reduce suferința multor familii . De exemplu, persoanele expuse riscului de a transmite boli legate de cromozomul X, cum ar fi hemofilia sau distrofia musculară Duchenne , pot acum crește probabilitatea de a concepe o fiică care nu manifestă boala .

Totuși , majoritatea persoanelor care se supun PGS o fac din motive non - medicale - pentru a - și „echilibra” familiile. Un posibil argument în favoarea acestei utilizări a tehnicii este că abilitatea de a selecta intenționat sexul dorit al unui copil ar putea reduce suprapopularea și povara economică asupra familiilor care s-ar - reproduce continuu pentru a căuta sexul dorit. Din același motiv, PGS ar putea reduce numărul de avorturi. De asemenea, este posibil ca PGS să crească fericirea ambilor părinți și a copiilor, deoarece copilul ar fi mai „dorit”.

Pe de altă parte , unii susțin că PGS nu servește nici individului, nici binelui comun. Aceștia afirmă că PGS este inerent sexist, bazat pe conceptul superiorității unui sex față de celălalt și duce la o întărire a ideii că valoarea copiilor depinde de genul lor . Alți critici se tem că aprobarea socială a PGS va deschide ușa către acceptarea altor manipulări genetice la copii . Este dificil de prezis toate efectele pe care PGS le - ar putea avea asupra lumii . Dar duhul selecției sexuale a ieșit acum din sticlă și nu are nicio dorință de a se întoarce .

Rândul tău

I. Acordați-vă timp, individual sau în grupuri, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a înțelege mai bine unele dintre problemele legate de subiectul selecției genului.

1. Ce argumente considerați valide pro și contra utilizării PGS?
2. Un concept moral și juridic general acceptat este cel al autonomiei reproductive – libertatea de a lua decizii individuale privind reproducerea fără interferențe externe. Credeți că există circumstanțe care ar justifica restricționarea autonomiei reproductive?

Cele de mai sus, precum și altele, au fost explorate într-o serie de articole din American - Journal of Bioethics, *Volumul 1 (2001). Vezi articolul lui J.A. Robertson de la paginile 2-9 pentru un rezumat al problemelor morale și juridice legate de PCS.*

3. Care credeți că sunt motivele pentru care unele societăți practică infanticidul feminin și preferă ca bărbații să se nască?

Pentru a afla mai multe despre acest subiect, vizitați site -ul web *„Gendercide Watch"* la adresa http://www.gendercide.org .

4. Dacă ați avea la dispoziție metode PGS sigure și eficiente , credeți că le-ați folosi pentru a vă ajuta în planificarea familială? În ce circumstanțe le-ați putea folosi ?

Institutul Cenetics și FIV (Fairfax , Virginia , SUA) utilizează tehnici PCS bazate pe sortarea spermatozoizilor într- un studiu clinic aprobat de FDA . Până în 2008, au avut loc deja peste 1.000 de sarcini , cu o rată de succes de aproximativ 80%. Puteți citi despre aceste metode pe site-ul lor web. http://www.microsort.net

STUDIU DE CAZ | O problemă cu un câine!

SAU

Un crescător de câini descoperă că unul dintre puii săi masculi are organe genitale anormale . După ce vizitează o clinică veterinară universitară din apropiere, crescătorul află că cariotipul cățelușului nu are un cromozom Y , dar are o pereche de cromozomi XX , unul dintre cromozomii X fiind puțin mai lung decât de obicei (fiind mamifere , masculii sunt în mod normal XY , iar femelele XX). Veterinarul îi spune că, în alte cuiburi , unele femele prezintă o pereche de cromozomi XY, cromozomul Y fiind ceva mai scurt decât în mod normal . Aceste observații ridică câteva întrebări interesante:

1. Ați putea oferi o explicație cromozomială pentru aceste două cazuri?
2. Cum ar putea fi folosite aceste cazuri pentru a localiza gena sau genele responsabile pentru acea anomalie?
3. Să presupunem că descoperiți o cățeluș cu o pereche de cromozomi XY de dimensiuni normale . Ce tip de mutație ar putea fi implicată în acest caz?
4. Să presupunem că descoperiți o cățeluș cu un singur cromozom X. Ce predicții ați putea face despre organele sexuale și capacitatea reproductivă a acelei cățeluș ?

resumen

1. Reproducerea sexuată depinde de diferențierea structurilor masculine și feminine responsabile de producerea gameților masculini și feminini, care, la rândul ei, este controlată de gene specifice, de cele mai multe ori adăpostite în cromozomi sexuali specifici.
2. Cromozomii sexuali specifici conțin informații genetice care controlează determinarea sexului și diferențierea sexuală.
3. Prezența sau absența unui cromozom Y care conține o genă *SRY intactă* este responsabilă de masculinitatea la oameni și la alte mamifere.
4. La oameni , deși sunt concepuți mult mai mulți bărbați decât femei și deși supraviețuiesc *in utero mai puțini* embrioni și fetuși masculi decât femei, se nasc totuși mai mulți bărbați decât femei.
5. La mamifere, celulele somatice feminine dezactivează aleatoriu unul dintre cei doi cromozomi X în timpul dezvoltării embrionare incipiente , un proces de mare importanță în echilibrarea expresiei genelor legate de X la masculi și femele.
6. Ipoteza Lyon afirmă că , într - un stadiu incipient de dezvoltare, cromozomul X matern sau patern este inactivat în fiecare celulă și că toate celulele descendente inactivează ulterior același cromozom . Astfel, mamiferele femele se dezvoltă ca mozaicuri în ceea ce privește exprimarea alelelor heterozigote legate de X.
7. Multe reptile prezintă efecte dependente de temperatură asupra determinării sexului . Deși cromozomii sexuali specifici determină sexul genotipic la multe reptile, efectele temperaturii asupra genelor implicate în determinarea sexului influențează dacă un embrion va dezvolta un fenotip masculin sau feminin.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

1. La *Drosophila,* cromozomii X pot fi fuzionați (XX) în așa fel încât să se separe întotdeauna împreună. Unele musculițe au atât cromozomi X fuzionați, cât și un cromozom Y.

   (a) Ce sex ar avea o astfel de muscă? Explică de ce.

   (b) Având în vedere răspunsul de la punctul (a), preziceți sexul urmașilor care ar rezulta dintr-o încrucișare între această muscă și o muscă normală de sex opus.

   (c) Dacă urmașii descriși în secțiunea (b) sunt lăsați să se încrucișeze, care ar fi rezultatul?

   Soluție

   (a) Musca ar fi femelă. Raportul dintre cromozomii X și autozomi — care determină sexul la *Drosophila* — ar fi de 1,0, rezultând dezvoltarea unor femele normale. La *Drosophila,* cromozomul Y nu are nicio - influență asupra determinării sexului.

   (b) Toate mușteleor avea două seturi de autozomi, împreună cu una dintre următoarele compoziții de cromozomi sexuali:

   (1) *XX X* — * o metafemeie cu trei cromozomi X (trisomică).

   (2) *(XX) Și* — » o femeie ca mama ei .

   (3) *XY* —* un bărbat normal.

   (4) YY —» nu are loc nicio dezvoltare.

   (c) S-ar forma o tulpină care ar menține femele cu cromozomii X uniți, generație după generație .

2. Antigenul de suprafață celulară Xg este codificat de o genă situată pe cromozomul X. Nu există o genă omoloagă pe cromozomul Y. Au fost identificate două alele codominante ale acestei gene : Xg1 și *Xg2.* O femeie cu genotipul *Xg2/Xg2* care s-a căsătorit cu un bărbat de genotip *Xgl/Y,* Au avut un copil cu sindromul Kleinefelter cu genotip *XgUXgUY.* Folosind terminologia genetică adecvată , explicați pe scurt cum a apărut acest individ . La ce părinte și la ce diviziune meiotică a apărut eroarea ?

   Soluție. Deoarece fiul cu sindrom Klinefelter este Xg1Xg2Y , el trebuie să fi primit atât alela *Xg1* , cât și cromozomul Y de la tatăl său. Prin urmare , nedisjuncția trebuie să fi avut loc în timpul meiozei I la tată .

Problemas y preguntas para la discusión

ZJJ- *Para ver los problemas y tutoriales asignados por el profesor, consulte www.masteringgenetics.com*

ÓMO LO SABEMOS

1. En este capítulo, nos hemos centrado en la diferenciación sexual, en los cromosomas sexuales y en los mecanismos genéticos implicados en la determinación del sexo. Al mismo tiempo, hemos encontrado numerosas oportunidades para considerar los métodos y razonamientos que permiten adquirir buena parte de esta información. A partir de las explicaciones proporcionadas en el capítulo, ¿qué respuestas propondría para las siguientes cuestiones fundamentales?
   (a) ¿Cómo sabemos que una serie de genes específicos en el maíz desempeñan un papel en la diferenciación sexual?
   (b) ¿Cómo sabemos si un cromosoma heteromórfico como el cromosoma Y desempeña o no un papel crucial en la determinación del sexo?
   (c) ¿Cómo sabemos que en los seres humanos los cromosomas X no desempeñan ningún papel en la determinación del sexo, mientras que el cromosoma Y provoca masculinidad y su ausencia provoca feminidad?
   (d) ¿Cómo hemos llegado a saber que aunque la proporción de sexos en los seres humanos en el nacimiento favorece a los hombres ligeramente, la proporción de sexos en la concepción les favorece mucho más?
   (e) ¿Cómo sabemos que *Drosophila* utiliza un mecanismo de determinación del sexo diferente del de los mamíferos, aun cuando tiene las mismas composiciones de cromosomas sexuales en machos y hembras?
   (f) ¿Cómo sabemos que la inactivación del cromosoma X de homólogo materno o paterno es un suceso aleatorio que tiene lugar durante el desarrollo temprano en las hembras de los mamíferos?

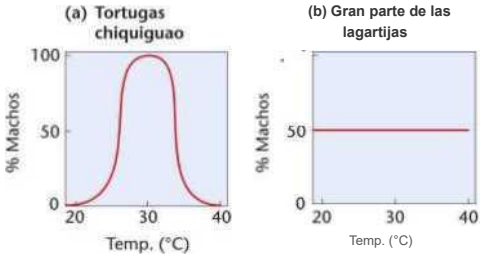
2. *Como* términos relacionados con la determinación del sexo,
   (a) ¿qué quiere decir cromosomas homomórficos y hetero- mórficos?
   (b) ¿qué quiere decir organismos isógamos y heterógamos?
3. Compare el ciclo biológico de una planta, como *Zea mays,* con el de un animal, como C. *elegans.*
4. Discuta el papel de la diferenciación sexual en los ciclos biológicos de *Chlamydomonas, Zea mays* y C. *elegans.*
5. Distinga entre los conceptos de diferenciación sexual y determinación sexual.
6. Compare los tipos de determinación sexual *Protenor* y *Lygaeus.*
7. Describa las diferencias principales entre la determinación del sexo en *Drosophila* y en la especie humana.
8. ¿Cómo resuelven los mamíferos, incluyendo los seres humanos, el problema de «dosificación» provocado por la presencia de un cromosoma X y otro cromosoma Y en uno de los sexos y de dos cromosomas X en el otro sexo?
9. El fenotipo de un embrión humano en una etapa temprana se considera sexualmente indiferente. Explique por qué esto es así a pesar de que el sexo genotipico del embrión ya está fijado.
10. ¿Qué observaciones específicas (pruebas) apoyan las conclusiones acerca de la determinación del sexo en *Drosophila* y en la especie humana?
11. Describa cómo la no disyunción en los gametos femeninos humanos puede dar lugar a descendientes con los síndromes de Turner y de Klinefelter después de ser fecundados por un gameto masculino normal.

12. Se descoperă o specie de insectă la care sexul heterogenetic este necunoscut. Se descoperă o mutație recesivă legată de trăsătura X *cu aripi reduse (rw),* care provoacă apariția aripilor reduse . Comparați generațiile p1 și F2 ale unei încrucișări între o femelă cu aripi reduse și un mascul cu aripi normale, când
    (a) femela este sexul heterogametic ;
    (b) Sexul masculin este heterogametic,
13. Când vacile nasc gemeni fraterni (gemeni de sexe diferite), femela fiică este de obicei sterilă și are organe reproducătoare masculinizate. Această femelă se numește freemartin. La vaci, gemenii pot avea o placentă comună și, prin urmare , circulație fetală. Preziceți de ce se dezvoltă o freemartin . (Freemartin: o femelă sterilă cu comportament masculinizat și ovare nefuncționale.)
14. O muscă femelă cu cromozomi X fuzionați, *XXY* (vezi secțiunea „Idei și soluții"), exprimă fenotipul recesiv legat de cromozomul X pentru ochii albi . Ea este încrucișată cu un mascul care exprimă mutația recesivă legată de cromozomul X pentru aripile artificiale. Determinați rezultatul acestei încrucișări în funcție de sexul, culoarea ochilor și dimensiunea aripilor urmașilor.
15. Să presupunem că, rareori, cromozomii X atașați se desprind în gameții unei femele. Pe baza fenotipurilor paterne din problema 14, ce rezultate ale generației F1 ar indica faptul că acest lucru s -a produs în meioza femelei?
16. S-a sugerat că orice gene care determină masculinitatea, situate pe cromozomul Y uman , nu pot fi localizate în mica regiune care face sinapsă cu cromozomul X în timpul meiozei. Care ar fi rezultatul dacă aceste gene ar fi localizate în acea regiune?
17. Ce este UN corp de Barr și unde se găsește în celulă ?
18. Indicați numărul așteptat de corpi Barr în celulele în interfază la următorii indivizi: cu sindrom Klinefelter ; cu sindrom Turner ; cu cariotipurile 47,XYY, 47,XXX și 48,XXXX.
19. Ipoteza Deúnala de Lyon.
20. Poate fi testată ipoteza lui Lyon la femei homozigote pentru o alelă a genei *G6PD ?* Legat de X? De ce sau de ce nu?
21. Preziceți posibilul efect al ipotezei Lyon asupra retinei unei femei heterozigote pentru daltonism legat de X.
22. Crescătorii de pisici știu că pisoii care prezintă modelul de blană calico și carapace de broască țestoasă legat de X sunt invariabil femele. De ce ?
23. Ce sugerează necesitatea aparentă a mecanismului de compensare a dozei despre exprimarea informației genetice la indivizii diploizi normali ?
24. Cum diferă procesul de compensare a dozei cromozomului X la Drpsopjúta de procesul echivalent la oameni ?
25. De unde știm că raportul primar dintre sexe la specia umană este între 1,20 și 1,60?
26. Formulați cât mai multe ipoteze posibil pentru a explica de ce există mai multe sarcini la bărbați decât la femei.
27. La șoareci, *gena Sry (vezi* Secțiunea 7.3) este situată pe cromozomul Y , foarte aproape de una dintre regiunile pseudoautosomale care se împerechează cu cromozomul X în meioza masculină. Pe baza acestor informații , propuneți un model care explică generarea excepțională de masculi cu doi cromozomi X (cu o porțiune din cromozomul Y, conținând gena *Sry* , atașată la un cromozom X).
28. Genele care codifică proteinele ochiului uman care detectează roșul și verdele sunt situate aproape una de cealaltă pe cromozomul X și probabil au apărut în evoluție dintr-o genă ancestrală comună pentru pigment. Cele două proteine au o omologie de 76 % în secvența lor de aminoacizi . O femeie cu vedere normală și o copie a fiecărei gene pe fiecare dintre cromozomii X are un fiu daltonist , despre care se arată că are o copie a genei care detectează verdele și nicio copie a genei care detectează roșul . Explicați la nivel cromozomial (în meioză) cum este posibil acest lucru .
29. Care este rolul enzimei aromatază în diferențierea sexuală la reptile?

Problemas extrapicantes

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

30. La șoareci , mutația legată de cromozomul X, *feminizarea testiculară (Tfm), elimină* răspunsul normal la hormonul testicular testosteron în diferențierea sexuală. Un șoarece XY care poartă alela *Tfm* pe cromozomul X dezvoltă testicule, dar nu suferă o diferențiere masculină - organele genitale externe ale unui astfel de animal sunt feminine. Din aceste informații, ce se poate concluziona despre rolul produsului genetic *Tfm* și al cromozomilor X și Y în determinarea și diferențierea sexului la mamifere? Puteți proiecta un experiment, presupunând că puteți utiliza ingineria genetică pe cromozomii șoarecilor, pentru a testa și confirma explicația dumneavoastră?
31. La viespea *Eraron hebetor,* o formă de partenogeneză (în care ouăle nefertilizate inițiază dezvoltarea) nu este neobișnuită , rezultând indivizi haploizi. Toți indivizii haploizi sunt masculi. Atunci când urmașii sunt produși ca urmare a fertilizării, aceștia sunt aproape întotdeauna femele. P.W. Whiting a arătat că o genă legată de X , cu nouă alele multiple (X^ etc.), controlează determinarea sexului . Orice stare homozigotă sau hemizigotă are ca rezultat masculi, în timp ce orice stare heterozigotă are ca rezultat femele. Dacă o femelă X $_{d}$ /X|, care se împerechează cu un mascul X„, depune 50 % ouă fertilizate și celelalte 50% ouă nefertilizate, ce proporție de masculi și femele va exista printre urmași?
32. Mai jos sunt două grafice care arată procentul de masculi care apar în raport cu temperatura atmosferică în timpul dezvoltării timpurii a ouălor fertilizate la (a) țestoasele chiquiguaoy și (b) multe șopârle. Interpretați aceste date în funcție de relația lor cu efectul temperaturii asupra determinării sexului.
33. Când s-a născut pisica clonată Carbon Copy (CC) (vezi secțiunea „Rezolvă acum problema" de la pagina 203), aceasta avea pete negre și albe , dar nu avea marcaje portocalii. Studenții sârguincioși la genetică nu au fost surprinși de acest rezultat. Începând cu celula ovariană somatică utilizată ca sursă a nucleului în procesul de clonare , voi explica de ce s-a produs acest rezultat.



Copie la carbon cu mama sa adoptivă.

34. În diverse organisme, inclusiv *Drosophila* La fluturi și molii au fost descrise gene care modifică raportul dintre sexe . Oamenii de știință sunt interesați în special de astfel de gene la speciile *Musca domestica* (musca de casă), *Aedes aegypti* (țânțarul care acționează ca vector pentru febra galbenă) și *Culex pipiens* (țânțarul care acționează ca vector pentru filarioză și unele boli virale). Sexul la *Culex* este determinat de o singură pereche de gene, *Mm fiind* mascul și *rnm* femelă. Masculii homozigoți pentru gena recesivă *dd nu produc* niciodată mulți urmași femele. Combinația *dd* la masculi provoacă fragmentarea diadei care conține cromozomul *m* în timpul primei diviziuni meiotice, prin urmare, eșecul lor de a finaliza spermatogeneza .

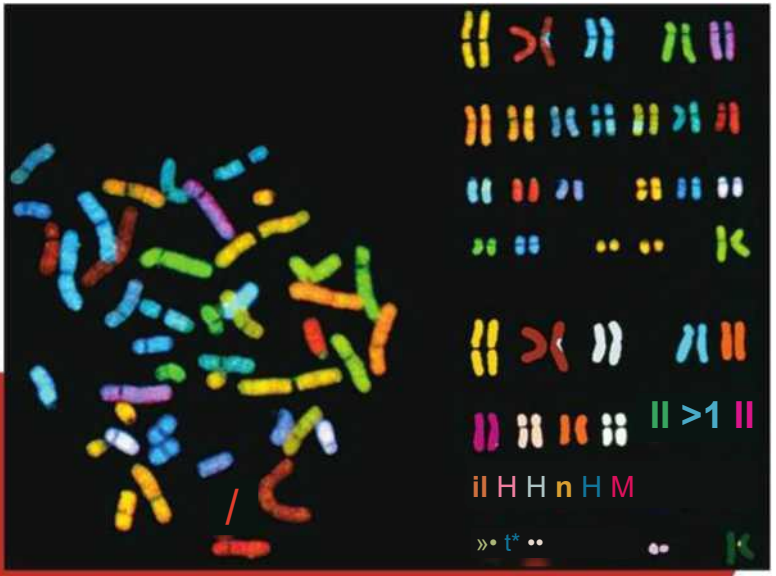
(a) Explicați această distorsiune a raportului dintre sexe desenând - aranjamentele cromozomiale etichetate în spermatozocitele primare și secundare pentru fiecare dintre următoarele genotipuri : *Mm, Dd* și *Mm, dd.* Cum diferă produsele meiotice între genotipurile *Dd* și *dd?* Rețineți că numărul cromozomilor diploizi este 6 la *Culex pipiens* și că locusurile *D și M* sunt legate pe același cromozom.

(b) Cum poate fi utilizat un factor de distorsiune a raportului de sexe , cum ar fi *dd,* pentru a controla populațiile acestor insecte dăunătoare?

35. La pui, a fost identificată recent o genă cheie implicată în determinarea sexului . Numită *DMRTI,* aceasta este situată pe cromozomul Z și lipsește de pe cromozomul W. La fel ca *SRY* la oameni , această genă determină masculinitatea . Cu toate acestea, spre deosebire de *SRY...* La oameni, femelele de găină *(ZW)* Găinile au o singură copie, în timp ce masculii (ZZ) au două copii ale genei. Cu toate acestea, aceasta este transcrisă doar în testiculele în curs de dezvoltare. Lucrând în laboratorul lui Andrew Sinclair (co - descoperitor al genei SRY umane *)* , Craig Smith și colegii săi au reușit să „ descifreze" expresia DMRTI în embrionii ZZ folosind tehnici de interferență ARN *(vezi* Capitolul 17). În astfel de cazuri, gonadele în curs de dezvoltare seamănă mai mult cu ovarele decât cu testiculele [Nature 461: 267 (2009)]. Ce concluzii ați putea trage despre rolul pe care îl joacă gena *DMRTI* la găini, spre deosebire de rolul pe care îl joacă gena *SRY* la oameni?

36. Paradigma la vertebrate este că, odată ce are loc determinarea sexului și se formează testiculele sau ovarele, diferențierea sexuală secundară (caracteristici masculine versus feminine) depinde de hormonii masculini sau feminini produși. Recent, D. Zhao și colegii săi au studiat trei pui care erau ginandromorfi bilateral, cu partea dreaptă a corpului clar femelă și partea stângă clar masculină [Nature 464: 237 (2010)]. Propuneți o serie de întrebări experimentale care ar putea fi investigate folosind acești pui pentru a testa această paradigmă. Ce interpretare alternativă contrastează cu această paradigmă?

Cariotip spectral al cromozomilor umani, utilizând sonde de „pictură" marcate diferențial.



8

Mutații cromozomiale: variații ale numărului și aranjamentului cromozomilor

CONCEPTE CAPITOL

►► Eșecul separării corecte a cromozomilor în timpul meiozei duce la o variație a conținutului cromozomial al gameților și, în consecință, al urmașilor care provin din acești gameți.

Plantele tolerează adesea o cantitate anormală de informații genetice , dar, prin urmare, prezintă fenotipuri distinctive . O astfel de variație genetică a fost un factor important în evoluția plantelor .

La animale, informația genetică se află într -un echilibru delicat , astfel încât câștigarea sau pierderea unui cromozom, sau a unei părți a unui cromozom, într-un organism altfel diploid, duce adesea la letalitate sau la un fenotip anormal.

Rearanjarea informațiilor genetice în genomul unui organism diploid poate fi tolerată de organismul respectiv , dar poate afecta viabilitatea gameților și fenotipurile care apar din acești gameți.

►► Cromozomii la oameni conțin situsuri fragile, susceptibile de rupere în anumite condiții , care dau naștere la fenotipuri anormale.

În capitolele anterioare , am subliniat modul în care mutațiile și alelele rezultate afectează fenotipul unui organism și modul în care trăsăturile sunt transmise de la părinți la urmași conform principiilor mendeliene . În acest capitol, vom studia Variație fenotipică care apare ca urmare a unor modificări mai semnificative decât alterarea unor gene specifice — modificări la nivel cromozomial.

Deși majoritatea membrilor speciilor diploide au în mod normal exact două seturi haploide de cromozomi, sunt cunoscute multe cazuri de variație a acestui model . Modificările includ modificări ale numărului total de cromozomi, duplicarea sau ștergerea genelor sau a segmentelor de cromozomi și rearanjarea materialului genetic în cadrul sau între cromozomi. Colectiv, astfel de modificări sunt numite mutații cromozomiale sau aberații cromozomiale, pentru a le distinge de mutațiile genetice. Întrucât, conform legilor mendeliene, cromozomul este unitatea de transmitere genetică, aberațiile cromozomiale sunt transmise urmașilor într-un mod previzibil, rezultând multe rezultate genetice unice.

Deoarece structura genetică a unui organism este delicat echilibrată, chiar și mici modificări ale conținutului sau locației informațiilor genetice în cadrul genomului pot duce la o formă de variație fenotipică. Modificările foarte substanțiale pot fi letale, în special la animale. Pe parcursul acestui capitol, vom analiza multe tipuri de aberații cromozomiale, consecințele lor fenotipice pentru organismul care le posedă și impactul aberației asupra urmașilor indivizilor afectați. De asemenea, vom discuta rolul aberațiilor cromozomiale în procesul evolutiv.

EŒ

Variația numărului de cromozomi: terminologie și origine

Variația numărului de cromozomi variază de la adăugarea sau pierderea unuia sau mai multor cromozomi până la adăugarea unuia sau mai multor seturi haploide de cromozomi. Înainte de a începe această discuție, va fi util să clarificăm terminologia care descrie astfel de modificări. În situația generală cunoscută sub numele de aneuploidie, un organism câștigă sau pierde unul sau mai mulți cromozomi, dar nu un set complet. Pierderea unui singur cromozom într-un genom diploid se numește *monosomie.* Câștigul unui cromozom are ca rezultat *trisomie.* Astfel de modificări contrastează cu situația euploidiei , unde sunt prezente seturi haploide complete de cromozomi. Dacă sunt prezente mai mult de două seturi , termenul aplicabil este poliploidie. Organismele cu trei seturi sunt în mod specific *triploide,* cele cu patru seturi sunt *tetraploide* și așa mai departe. Tabelul 8.1 oferă un compendiu organizat de urmărit atunci când vorbim despre fiecare dintre aceste categorii de aneuploidii și euploidii și subseturile lor.

H pentru variația numărului H de cromozomi

Termen	Explicație
Aneuploidii	$2n \pm x$ cromozomi
Monosomie	$2n - 1$
Disomie	$2n$
Trisomie	$2n + 1$
Tecrasomie, pentasomie etc.	$2n + 2$, $2n + 3$, etc.
Euploidiile	Multipli de n
Diploidie	$2n$
Poliploidie	$3n$, $4n$, $5n$, ...
Triploidie	$3n$
Tetraploidia, pentaploidia etc.	$4n$, $5n$ etc.
Autopoliploidie	Multipli ai aceluiași genom
Alopoliploidie	Multipli de genomi
(amfidiploidie)	strâns legate

Atunci când se analizează cazurile de câștig sau pierdere de cromozomi, este util să se examineze modul în care apar astfel de aberații. De exemplu, cum apar sindroamele în care numărul de cromozomi care determină sexul la oameni este modificat, așa cum este descris în Capitolul 7? După cum vă amintiți, câștigul (47,XXY) sau pierderea (45, X) a unui cromozom X într-un genom diploid modifică fenotipul normal, rezultând sindroamele Klinefelter sau Turner , respectiv *(* vezi Figura 7.6). De asemenea, se știe că există femei care au cromozomi X suplimentari (de exemplu, 47,XXX, 48,XXXX) și bărbați care au un cromozom Y suplimentar (47,XYY).

O astfel de variație cromozomială își are originea într- o eroare aleatorie în timpul producției de gameți , un fenomen cunoscut sub numele de non-disjuncție, în care cromozomii omologi perechi nu se separă în timpul segregării. Acest proces perturbă distribuția normală a cromozomilor între gameți . Figura 8.1 prezintă rezultatele non-disjuncției în meioza I și II pentru un cromozom dintr -un organism diploid. După cum se poate observa, se pot forma gameți anormali care conțin fie doi membri ai cromozomului afectat, fie niciunul. Fertilizarea acestora cu un gamet haploid normal are ca rezultat zigoți cu trei membri (trisomie) sau cu un singur membru (monosomie) al acestui cromozom. Non-disjuncția duce la o serie de afecțiuni aneuploide la oameni și la alte organisme.

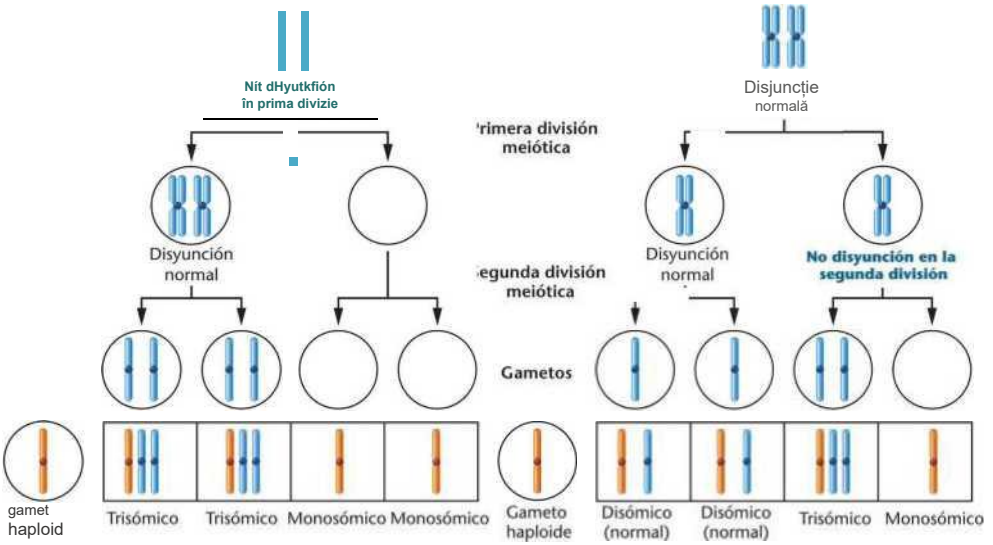


FIGURA 1.1 Non-disjuncție în timpul primei *și celei de-a doua diviziuni meiotice. În ambele cazuri, unii dintre gameții formați au doi membri ai unui anumit cromozom sau le lipsește acel cromozom. După fertilizarea cu un gamet haploid normal,* se produc zigoți monosomici, disomici (normali) *și* trisomici .

ACUM REZOLVĂ ASTA

8.1 O femeie cu sindrom Turner (47^I) prezintă, de asemenea, trăsătura hemofiliei legată de cromozomul X, la fel ca și tatăl ei. Care dintre părinții ei a suferit de non-disjuncție în timpul meiozei, rezultând gametul responsabil pentru sindrom?

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care non-disjuncția duce la aneuploidie. Cheia rezolvării acesteia este să analizăm mai întâi sindromul Turner, pe care l-am discutat deja și pe care l-am acoperit în detaliu și în Capitolul 7, și apoi să luăm în considerare faptul că femeia exprimă hemofilie, pentru a lua în considerare în final care părinte a furnizat un gamet cu un cromozom X care a suferit o meioză normală.*

HEI

Monosomia și trisomia au ca rezultat diverse efecte fenotipice

Să revenim acum la analiza variației numărului de autozomi și a consecințelor genetice ale unor astfel de modificări . Cele mai frecvente exemple de *aneuploidie,* atunci când un organism are un număr de cromozomi altul decât multiplul exact al complementului haploid, sunt cazurile în care un singur cromozom este adăugat sau pierdut dintr - un complement diploid normal.

Monosomie

Pierderea unui cromozom duce la o deficiență a complementului - I și se numește monosomie. Deși monosomia pentru cromozomul X apare la oameni , așa cum am văzut în sindromul Turner 45,X, monosomia pentru oricare dintre autozomi nu este în mod normal tolerată la oameni sau animale. La *Drosophila,* mușteleț monosomice pentru micul cromozom IV (care conține mai puțin de 5% din genele organismului) se dezvoltă mai lent, au o dimensiune corporală redusă , iar viabilitatea lor este afectată. Monosomia pentru cromozomii mari II și III este aparent letală, deoarece astfel de muște nu au fost niciodată găsite .

Incapacitatea indivizilor monozomi de a supraviețui este la prima vedere complet derutantă, deoarece există cel puțin o copie a fiecărei gene în omologul rămas. Cu toate acestea, dacă doar una dintre aceste gene este reprezentată de o alelă letală , condiția de decuplare cromozomială va duce la moartea organismului. Acest lucru se întâmplă deoarece monosomia demască genele letale recesive care, în alte condiții, ar fi tolerate la indivizii heterozigoți

care posedă alelele de tip sălbatic corespunzătoare. O altă posibilă cauză a letalității aneuploidiei este că o singură copie a unei gene recesive poate fi insuficientă pentru a oferi o funcție adecvată pentru a susține organismul, un fenomen numit haploinsuficiență.

În regnul vegetal, aneuploidia este mai bine tolerată. Monosomia pentru autozomi a fost observată la porumb, tutun, luminiță de seară *(Oenothera)* și datura spinoasă *(Datura), printre alte plante. Cu toate acestea, astfel de plante monosomice sunt aproape întotdeauna* mai puțin viabile decât plantele diploide din care provin. Granulele de polen trebuie să se dezvolte extensiv înainte de a participa la fertilizare, sunt deosebit de sensibile la pierderea unui cromozom și sunt rareori viabile.

Trisomie

În general, efectele trisomiei *(2n* + 1) sunt similare cu cele ale monosomiei. Cu toate acestea, adăugarea unui cromozom suplimentar are ca rezultat mai mulți indivizi viabili decât pierderea unui cromozom, atât la speciile animale, cât și la cele vegetale . La animale , acest lucru este adesea valabil, cu condiția ca cromozomul implicat să fie relativ mic. Cu toate acestea, adăugarea unui autosom mare la complementul diploid, atât la Drosophila , cât și la oameni , are efecte *grave* și este de obicei letală în timpul dezvoltării .

La plante, indivizii trisomici sunt viabili, dar fenotipul lor poate fi modificat. Un exemplu clasic este stramonio-ul spinos, *Datura,* al cărui număr diploid este 24. Sunt posibile doisprezece tipuri diferite de trisomii primare , iar exemple pentru fiecare au fost găsite . Fiecare trisomie modifică fenotipul capsulei fructului (Figura 8.2) suficient pentru a produce un fenotip unic. Inițial , s-a crezut că fenotipul acestor capsule a fost cauzat de mutații într-una sau mai multe gene.

Un alt exemplu este observat la orez *(Oryza sativa),* care are un număr haploid de 12 cromozomi . Tulpinile trisomice au fost izolate și studiate pentru fiecare cromozom - plantele cu 11 tulpini pot fi distinse între ele și de plantele de tip sălbatic . Tulpinile trisomice pentru cei mai lungi cromozomi sunt cele mai diferențiate și cresc mai lent decât celelalte. Acest lucru este în concordanță cu convingerea că cromozomii mai mari provoacă un dezechilibru genetic mai mare decât cei mai mici. În plus, structura frunzelor, frunzișul, tulpina, morfologia boabelor și înălțimea plantei variază între diferitele trisomii.

Sindromul Down: trisomia 21

Singura trisomie autosomală umană în care un număr semnificativ de indivizi supraviețuiesc după vârsta de 18 ani

FIGURA 8.2 Capsula fructului de *stramonium spinos,* al cărei fenotip este modificat distinct de fiecare dintre cele 12 condiții de trisomie posibile.

După naștere, a fost descoperit de Langdon Down în 1866. Acum se știe că sindromul este o consecință a trisomiei cromozomului 21, un cromozom din grupa G.‡‡ (Figura 8.3) și se numește sindrom Down sau, pur și simplu , trisomie 21 (denumită 47, 21+). Această trisomie apare la aproximativ 1 din 800 de nașteri vii. Deși acest lucru poate părea un eveniment rar și improbabil , în Statele Unite există aproximativ 4.000-5.000 de astfel de nașteri în fiecare an , iar în prezent există peste 250.000 de persoane în această țară cu sindrom Down.

Așa cum este tipic în cazul altor afecțiuni clasificate și drept sindroame, există multe caracteristici fenotipice care *pot* fi prezente în trisomia 21, dar orice individ afectat prezintă de obicei doar un set al acestor caracteristici. În cazul sindromului Down , există între 12 și 14 astfel de caracteristici, dar fiecare individ exprimă, în medie, între 6 și 8 dintre ele . Cu toate acestea, aspectul exterior al acestor indivizi este foarte similar, așa că seamănă izbitor unul cu celălalt. Acest lucru se datorează în principal unui pliu epicantal proeminent în jurul fiecărui ochi §§și unei fețe tipic aplatizate și a unui cap rotunjit . Persoanele cu sindrom Down

‡‡Pe baza dimensiunii și locației centromerului, cromozomii autozomali umani sunt împărțiți în șapte grupe: A (1-3), B (4-5), C (6-12), D (13-15), E (16-18), F (19-20) și G (21-22).

§§Pliul epicantal, sau epicantul, este un pliu epidermic de pe pleoapa superioară, care se extinde de la nas până la colțul interior al sprâncenei. Acesta acoperă colțul interior al ochiului și pare să- l micșoreze, dând ochiului un aspect oblic sau în formă de migdală. Epicantul este o caracteristică normală, proeminentă a ochilor la multe grupuri asiatice.

FIGURA 8.3 Cariotip și fotografie a unei fete cu sindrom Down (îmbrățișându-și sora neafectată din dreapta). Cariotipul prezintă trei membri ai cromozomului 21 din grupa G, rezultând condiția 47,21+ .

De asemenea, sunt caracteristic scunzi și pot avea o limbă proeminentă, acoperită cu blană (care face ca gura să rămână parțial deschisă) și mâini scurte și late, cu un model distinct de amprente digitale și palme. Dezvoltarea fizică, psihomotorie și mentală este întârziată, iar tonusul muscular scăzut este caracteristic. Deși speranța lor de viață este mai scurtă decât în mod normal, în jur de 50 de ani, există cazuri cunoscute de supraviețuire după 60 de ani.

Pentru a ilustra mai bine impactul unui singur cromozom suplimentar într-un genom altfel diploid, copiii cu sindrom Down sunt predispuși la boli respiratorii și defecte cardiace și au aproximativ [informații lipsă - probabil o greșeală de scriere pentru leucemie].

20 ori mai mare decât cea a populației generale. În plus, cauza decesului la adulții cu sindrom Down este frecvent boala Alzheimer. Debutul acestei boli apare la o vârstă mult mai fragedă decât în populația generală.

Întrucât sindromul Down este frecvent în populația noastră, înțelegerea bazei genetice a acestui sindrom a fost mult timp un obiectiv al cercetătorilor . Cercetările au condus la ideea că o regiune critică a cromozomului

21 Această trisomie conține genele sensibile la doză responsabile pentru numeroasele fenotipuri asociate cu sindromul. Această porțiune ipotetică a cromozomului a fost denumită regiunea critică a sindromului Down (DSCR). În 2004, a fost creat un model trisomic de șoarece pentru DSCR, deși unii șoareci nu prezintă caracteristicile sindromului. Cu toate acestea, această abordare - rămâne foarte importantă în cercetare .

Studiile actuale asupra regiunii DSCR, atât la oameni , cât și la șoareci, au condus la mai multe descoperiri interesante. Diverse investigații sugerează acum că prezența a trei copii ale genelor în această regiune este o condiție necesară, dar nu suficientă , pentru deficiențele cognitive caracteristice sindromului Down. O altă constatare se referă la o altă observație importantă despre sindromul Down - aceea că persoanele cu această afecțiune au un risc mai mic de a dezvolta diverse tipuri de cancer tumoral solide, inclusiv cancer pulmonar și melanom. Acest avantaj pentru sănătate a fost legat de prezența unei copii suplimentare a genei *DSCR1* , care codifică o proteină ce suprimă *factorul de creștere endotelial vascular* (*VEGF).* Această suprimare, la rândul său, blochează procesul de angiogeneză. Drept urmare, supraexprimarea acestei gene împiedică tumorile să dezvolte o vascularizație adecvată, încetinind astfel creșterea lor. Un studiu de 14 ani , publicat în 2002, care a implicat 17.800 de persoane cu sindrom Down, a relevat o reducere de aproximativ 10% a mortalității prin cancer în comparație cu o populație de control. Fără îndoială, studiul regiunii DSCR ne va oferi date importante în viitor .

Originea cromozomului 21 suplimentar în sindromul Down

Cel mai adesea , această trisomie apare din cauza nedisjuncției cromozomului 21 în timpul meiozei. Eșecul separării perechii de cromozomi omologi în timpul anafazei I sau II poate duce la gameți cu o compoziție cromozomială de $n + 1$. Aproximativ

75% din aceste erori care duc la sindromul Down sunt atribuite nedisjuncției în timpul meiozei I. Fertilizarea ulterioară de către un gamet normal are ca rezultat trisomia.

Analiza cromozomială a arătat că, deși cromozomul suplimentar poate proveni fie de la tată , fie de la mamă , ovulul este sursa în aproximativ 95% din cazurile de trisomie 47,21+. Înainte de dezvoltarea tehnicilor care utilizează markeri polimorfici pentru a distinge omologii materni de cei paterni , această concluzie a fost susținută de alte dovezi indirecte derivate din studii privind vârsta mamelor care au născut copii cu sindrom Down. Figura 8.4 prezintă relația dintre incidența nașterilor cu sindrom Down și vârsta maternă, ilustrând creșterea enormă odată cu creșterea vârstei materne. În timp ce frecvența este de aproximativ 1 la 1.000 când mama are 30 de ani , există o creștere de zece ori a incidenței, până la o frecvență de 1 la 100, la vârsta de 40 de ani. Frecvența crește și mai mult la 1 la 30 până la vârsta de 45 de ani. O statistică deosebit de alarmantă este că, atunci când vârsta mamei depășește 45 de ani, probabilitatea ca copilul să se nască cu sindrom Down continuă să crească substanțial. În ciuda acestor statistici, însă , mult peste jumătate dintre copiii născuți cu sindrom Down sunt născuți de mame sub 35 de ani, deoarece marea majoritate a sarcinilor din populația generală sunt în rândul femeilor sub această vârstă .

Deși probabilitatea nedisjuncției crește în mod clar odată cu vârsta, nu știm sigur de ce.

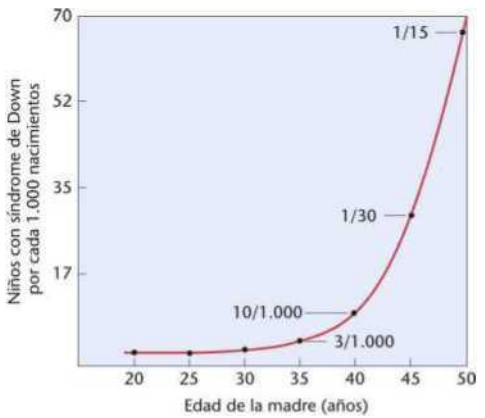


FIGURA 8.4 Incidența nașterilor cu sindrom Down în funcție de vârsta mamei.

Acest lucru se întâmplă. Totuși, există o observație care ar putea fi importantă. La femei, meioza la toate ovulele începe în timpul dezvoltării fetale , până în punctul în care au loc sinapsele omoloage și începe recombinarea . Apoi, dezvoltarea ovocitelor este oprită la meioza I. Prin urmare, toate ovocitele primare se formează la naștere. Apoi, odată ce ovulația începe la pubertate, meioza se reia la un ovul în timpul fiecărui ciclu ovulator și continuă până la meioza II. Procesul este oprit din nou după ovulație și nu este finalizat până la producerea fertilizării .

Rezultatul final al acestei progresii este că fiecare ovul eliberat succesiv a fost oprit în meioză I cu o lună mai mult decât în ciclul precedent. Prin urmare , o femeie cu vârsta cuprinsă între 30 și 40 de ani produce ovule care sunt semnificativ mai vechi și au fost oprite pentru o perioadă mai lungă decât cele ovulate în ultimii 10 sau 20 de ani. Dar, în ciuda logicii din spatele acestei ipoteze care explică incidența mai mare a sindromului Down pe măsură ce femeile îmbătrânesc, rămâne dificil de dovedit direct ipoteza.

Evident, aceste statistici reprezintă o problemă serioasă pentru femeile care rămân însărcinate mai târziu în anii lor reproductivi. Consilierea genetică timpurie este foarte recomandată în astfel de sarcini. Această consiliere informează părinții responsabili despre probabilitatea ca și copiii lor să fie afectați și îi educă despre sindromul Down. În timp ce unele persoane cu sindrom Down necesită plasament în instituții specializate, altele pot beneficia foarte mult de programe de educație specială și pot fi îngrijite acasă. În plus, acești copii se disting prin natura lor afectuoasă și blândă. Un consilier genetic poate recomanda o tehnică de diagnostic prenatal , în care celulele fetale sunt izolate și cultivate.

Amniocenteza și prelevarea de vilozități coriale (CVS) sunt cele mai cunoscute două metode, prin care celulele fetale sunt obținute din lichidul amniotic, respectiv din corionul placentei . Într - o - abordare mai recentă, celulele fetale și ADN-ul sunt obținute direct din circulația maternă, o tehnică numită diagnostic genetic prenatal neinvaziv (NIPGD *). Deoarece* este necesară doar o probă de 10 ml de sânge matern , această procedură va deveni din ce în ce mai frecventă, deoarece nu prezintă niciun risc pentru făt.

În ceea ce privește sindromul Down, odată ce celulele fetale au fost obținute și cultivate, cariotipul fătului poate fi determinat prin analiză citogenetică. Dacă fătul diagnosticat este afectat de sindromul Down, un avort terapeutic este de obicei o opțiune disponibilă părinților . Aceasta este evident o decizie dificilă care implică multe considerații religioase și etice.

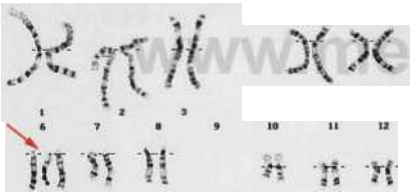
Întrucât sindromul Down este cauzat de o eroare aleatorie - nedisjuncția cromozomului 21 în timpul meiozei materne sau paterne - nu se așteaptă ca această anomalie să fie moștenită. Cu toate acestea, sindromul Down apare ocazional în familii. Aceste cazuri, numite *sindrom Down familial,* implică o translocație a cromozomului 21, un alt tip de aberație cromozomială, despre care vom discuta mai târziu în acest capitol.

Aneuploidia umană

Pe lângă sindromul Down, există doar două alte trisomii la om (și nicio monosomie) care permit fătului să supraviețuiască: sindromul Patau și sindromul Edwards (47, 13+ și, respectiv, 47, 18+). Cu toate acestea, acești indivizi prezintă malformații semnificative și mortalitate precoce. Figura 8.5 ilustrează cariotipul anormal și numeroasele defecte care caracterizează copiii cu sindrom Patau.

Observația anterioară ne duce la întrebarea dacă există multe alte afecțiuni aneuploidice care apar, dar fără ca fetușii afectați să reușească să supraviețuiască sarcinii.

; ; K TÍ K 7Ï dacă



13 14 isi* i? ia

-4-?- -$-gr '*^7* 't

i* 202122ST

Microcefalie,
Despicătură labio -palatinală,
Polidactilie, Unghii deformate ,
Retraso mental
Detención del crecimiento
Orejas deformes, insertadas más abajo
Defecto en el septo atrial
Defecto en el septo ventricular
Granulocitosis polimorfonucleada anormal
Chisturi renale, Ureter dublu ,
Hernie ombilicală , Anomalii de dezvoltare uterină , Criptorhidie

FIGURA 8.5 Descrierea cariotipului și fenotipului unui copil cu sindromul Patau, în care sunt prezenți trei membri ai cromozomului 13 din grupa D, rezultând condiția 47,13+.

Răspunsul este că acesta este într-adevăr cazul, așa cum a fost confirmat prin analiza cariotipică a fetușilor avortați spontan . Aceste studii dezvăluie două statistici surprinzătoare : (1) aproximativ 20% din totalul fertilizărilor se termină cu avort spontan (unele estimări sunt considerabil mai mari) și (2) aproximativ 30 % din totalul fetușilor avortați spontan prezintă un anumit tip de dezechilibru cromozomial . Acest lucru sugerează că cel puțin 6 % (0,20 x 0,30) din fertilizări conțin un complement cromozomial anormal. Un procent ridicat de fetuși cu anomalii cromozomiale suferă de un anumit tip de aneuploidie.

O analiză cuprinzătoare a acestui subiect realizată de David H. Carr a relevat că un procent semnificativ de fetuși avortați prezintă trisomie într- unul dintre grupurile cromozomiale . Trisomiile au fost detectate pentru toți cromozomii umani. Interesant este că monosomia cu cea mai mare incidență în rândul fetușilor avortați este afecțiunea 45, X, care are ca rezultat un copil cu sindrom Turner dacă fătul supraviețuiește sarcinii . Cu toate acestea, monosomiile autozomiale sunt foarte rare, chiar dacă non-disjuncția ar trebui să producă *n*- gameți . 1 cu o frecvență egală cu cea a gameților *n* + 1. Această constatare sugerează că gameții cărora le lipsește un singur cromozom sunt fie grav afectați funcțional , fie că embrionul moare atât de devreme în dezvoltare încât este detectat destul de rar . Am discutat deja cauzele potențiale ale letalității monosomice mai devreme în acest capitol. Studiul lui Carr a detectat, de asemenea, mai multe forme de poliploidie și diverse alte anomalii cromozomiale .

Luate împreună, aceste observații susțin ipoteza că dezvoltarea embrionară normală necesită un număr precis de cromozomi, care mențin un echilibru delicat în exprimarea informației genetice . Mortalitatea prenatală a majorității aneuploidiilor reprezintă o barieră împotriva introducerii acestor anomalii genetice în - populațiile umane .

8.3

Poliploidia, în care există mai mult de două seturi haploide de cromozomi, este predominantă la plante

Termenul poliploidie descrie cazurile în care există multipli mai mari de doi ai numărului haploid de cromozomi . Desemnarea poliploizilor se bazează pe numărul de seturi de cromozomi găsite: un triploid are 3n cromozomi; un tetraploid 4n; un pentaploid *5n* și așa mai departe (Tabelul 8.1). Se pot face mai multe afirmații generale despre poliploidie. Această afecțiune este

relativ rară la multe specii de animale, dar este bine documentată la șopârle, amfibieni și pești și este mult mai frecventă la speciile de plante. Numerele impare de seturi de cromozomi nu sunt în mod normal menținute în mod fiabil de la o generație la alta, deoarece un organism poliploid cu un număr impar de omologi nu produce în mod normal gameți echilibrați genetic. Din acest motiv, triploizii, pentaploizii și alții asemenea nu se găsesc în mod normal la speciile care se bazează exclusiv pe reproducerea sexuată pentru propagare.

Poliploidia poate apărea în două moduri: (1) Adăugarea unuia sau mai multor seturi suplimentare de cromozomi, identice cu setul haploid normal al aceleiași specii, are ca rezultat autopoliploidia; sau (2) combinarea seturilor de cromozomi de la specii diferite ca urmare a hibridizării, rezultând alopoliploidia (din grecescul * *allio*,* care înseamnă *alt* sau *diferit*). Distincția dintre autopoliploidie și alopoliploidie se bazează pe originea genetică a seturilor suplimentare de cromozomi, așa cum se arată în Figura 8.6.

În discuția noastră despre poliploidie, vom folosi anumite simboluri pentru a clarifica originea seturilor de cromozomi suplimentare. De exemplu, dacă A reprezintă setul haploid de cromozomi al oricărui organism, atunci

$$LA = \text{a}, + a_{2} + {}_{a}, + la + \ldots + o_{,,}$$

unde ii $_{p}$ d $_{2}$ > etc. reprezintă cromozomi individuali, iar *n* este numărul haploid. Folosind această nomenclatură, un organism diploid normal este reprezentat simplu ca *AA*.

Autopoliploidie

În autopoliploidie, fiecare set suplimentar de cromozomi este identic cu cel al speciei parentale. Prin urmare, triploizii sunt reprezentați ca AAA, tetraploizii ca AAAA și așa mai departe.

Autotriploizii apar în mai multe moduri. O incapacitate de a segrega toți cromozomii în timpul diviziunilor meiotice poate duce la formarea unui gamet diploid . Dacă un astfel de gamet este fertilizat de un gamet haploid, se produce un zigot cu trei seturi de cromozomi . Sau , ocazional, doi spermatozoizi pot fertiliza un ovul, rezultând un zigot triploid. Triploizii pot fi produși și în condiții experimentale prin încrucișarea diploizilor cu tetraploizii . Organismele diploide produc gameți cu *n* cromozomi , în timp ce tetraploizii produc 2n gameți . După fertilizare , se produce triploidul dorit .

Deoarece au un număr par de cromozomi, autotetraploizii (4n) sunt teoretic mai predispuși să se găsească în natură decât autotriploizii. Spre deosebire de triploizi, care produc adesea gameți dezechilibrați genetic cu un număr impar de cromozomi , tetraploizii sunt mai predispuși să producă gameți echilibrați atunci când se reproduc sexuat.

Este de mare interes pentru geneticieni să înțeleagă cum apare poliploidia în mod natural . În teorie, dacă cromozomii s-au replicat, dar celula -mamă nu se divide și reintră în interfază, numărul de cromozomi se va dubla. Faptul că acest lucru este probabil ceea ce se întâmplă este susținut de observația că celulele tetraploide pot fi produse experimental din celule diploide prin aplicarea unui șoc termic , fie cald, fie rece , asupra celulelor în meioză sau prin aplicarea de colchicină asupra celulelor somatice în mitoză . Colchicina, un alcaloid derivat din crocusul de toamnă , interferează cu formarea fusului de diviziune și, astfel, cromozomii replicați care nu se pot separa în anafază nu migrează către poli . Când colchicina este îndepărtată , celulele pot reintra în interfază . Când cromatidele surori pereche se separă și se desfac, nucleul conține de două ori mai mult număr diploid de cromozomi, deci va fi 4n. Acest proces este ilustrat în Figura 8.7.

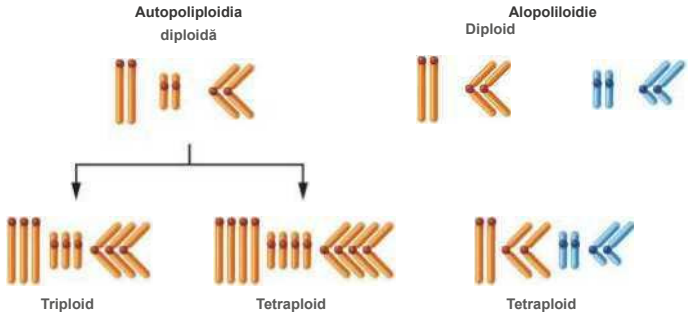


FIGURA 8.6 Comparație a originii cromozomilor unui cariotip autopoliploid și alopoliploid.

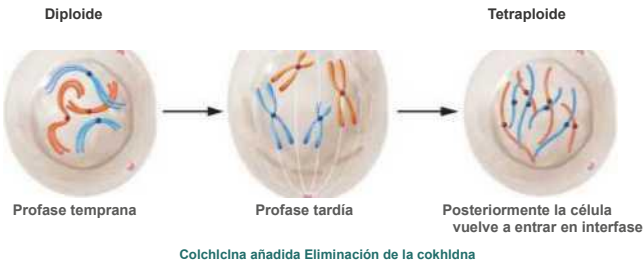


FIGURA 8.7 Implicația potențială a colchicinei în duplicarea numărului de cromozomi. Sunt prezentate două perechi de cromozomi omologi. Deși fiecare cromozom și-a replicat ADN-ul la începutul interfazei, cromozomii nu apar ca structuri duble până la sfârșitul profazei. Când anafaza nu are loc normal, numărul de cromozomi se dublează dacă celula reintră în interfază.

În general, autotetraploidele sunt mai mari decât rudele lor diploide. Această creștere pare să se datoreze unei creșteri a dimensiunii celulelor, mai degrabă decât unei creșteri a numărului de celule . Deși autopoliploidele nu au informații noi sau unice în comparație cu rudele lor diploide, florile și fructele acestor plante sunt adesea mai mari, ceea ce face ca astfel de soiuri să fie extrem de valoroase din punct de vedere agricol și comercial. Plantele triploide importante din punct de vedere economic includ mai multe specii de cartofi din genul *Solatium,* merele *Winesap ,* bananele comerciale, pepenele verzi fără semințe și crinul tigru cultivat , *Lilium tigrinum.* Aceste plante se propagă asexuat. Bananele diploide au semințe tari, dar soiul triploid comercial „fără semințe" are semințe comestibile. Soiurile tetraploide de lucernă, cafea, arahide și mere McIntosh sunt, de asemenea , valoroase din punct de vedere economic, deoarece sunt mai mari sau cresc mai viguros decât rudele lor diploide sau triploide. Multe dintre cele mai populare soiuri din genul *Hosta* sunt tetraploide. În toate cazurile , frunzele sunt mai groase și mai mari, frunzișul este mai vibrant, iar planta crește mai viguros. Soiul comercial de căpșuni este octoploid.

De mult timp suntem curioși despre modul în care celulele cu niveluri crescute de ploidie, unde nu sunt prezente gene noi , exprimă fenotipuri diferite față de omologii lor diploizi. Capacitatea noastră actuală de a examina expresia genelor folosind biotehnologia modernă a oferit câteva perspective interesante. De exemplu, Gerald Fink și colegii săi au reușit să creeze tulpini de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* cu una, două, trei sau patru copii ale genomului. Astfel, fiecare tulpină are gene identice (se spune că sunt izogene), dar niveluri diferite de ploidie . Acești oameni de știință au examinat apoi nivelurile de expresie ale tuturor genelor pe parcursul întregului ciclu de viață al organismului . Folosind o măsură destul de strictă a expresiei genelor, înmulțită sau împărțită la 10 , Fink și colegii săi au identificat zece cazuri în care expresia genelor a crescut de cel puțin zece ori pe măsură ce ploidia a crescut și șapte cazuri în care a scăzut în mod similar .

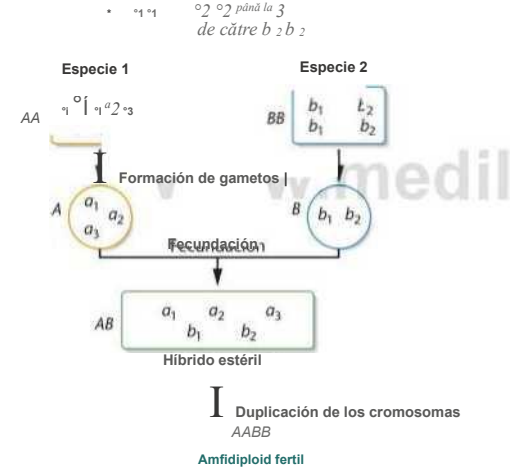
Una dintre aceste gene a oferit informații despre motivul pentru care celulele poliploide sunt mai mari decât omologii lor haploizi sau diploizi. În drojdia poliploidă, două cidine Gl, Clnl și Pel1 , sunt reprimate pe măsură ce ploidia crește, în timp ce dimensiunea celulelor de drojdie crește . Acest lucru se explică prin faptul că - cidinele Gl facilitează trecerea celulelor prin Gl , care încetinește atunci când expresia acestor gene este reprimată. Celula poliploidă petrece mai mult timp în faza Gl și, în medie, crește înainte de a trece de la stadiul Gl al ciclului celular. Celulele de drojdie prezintă, de asemenea, diferențe morfologice pe măsură ce ploidia crește . Unele dintre celelalte gene reprimate odată cu creșterea ploidiei sunt implicate în dinamica citoscheletului , ceea ce explică modificările morfologice.

Alopoliploidie

Poliploidia poate rezulta și din hibridizarea a două specii strâns înrudite . Dacă un ovul haploid dintr-o specie cu complement cromozomial AA este fertilizat de un spermatozoid dintr-o specie cu complement cromozomial BB, rezultatul va fi un hibrid AB, unde A = u lt a^2 , a ,... a,, și $_B$ = b¡, b^2 , $_b$¡ ,... b,,. O plantă hibridă poate fi sterilă din cauza incapacității sale de a produce gameți viabili. Acest lucru se întâmplă adesea atunci când *lipsesc* unii sau toți - cromozomii . și *b* Nu sunt omoloage și, prin urmare, nu pot forma sinapse în timpul meiozei. În consecință , apare o situație dezechilibrată genetic . Cu toate acestea, dacă noua combinație genetică

AB suferă o duplicare cromozomială, fie naturală , fie indusă , vor exista două copii ale tuturor cromozomilor . și două copii ale tuturor cromozomilor *b* se pot împerechea în timpul meiozei. Drept urmare, *se va produce un* AABB tetraploid fertil . Acest proces este ilustrat în Figura 8.8. Deoarece acest poliploid conține echivalentul a patru genomuri haploide derivate din două specii diferite, un astfel de organism se numește alotetraploid. Atunci când cele două specii-părinte sunt cunoscute, termenul de echivalent amfidiploid este preferat pentru a descrie alotetraploidul.

Plantele amfidiploide se găsesc frecvent în natură. Succesul lor reproductiv se bazează pe capacitatea lor de a forma gameți echilibrați. Deoarece există doi omologi ai fiecărui cromozom, meioza poate decurge normal (Figura 8.8), iar fertilizarea poate propaga cu succes planta pe cale sexuată. În această discuție, presupunem cea mai simplă situație, în care niciunul dintre cromozomii din setul A nu este omolog cu cei din setul *B.* La amfidiploide, formate de specii mai strâns înrudite



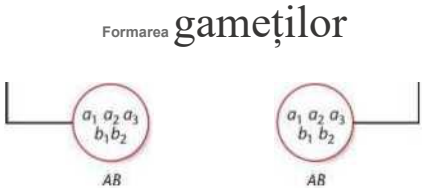


FIGURA 8.8 Originea *și* propagarea unui amfidiploid. Specia 1 are genomul *A,* cu trei cromozomi, *a* _F , *a* ₂ *și a* ₃ . Specia 2 are genomul *B, cu* doi cromozomi, *b și b* ₂ . După fertilizarea dintre membrii celor două specii *și* duplicarea cromozomilor, se formează un amfidiploid fertil, care are două genomuri diploide complete *(AABB).* Întrucât speciile sunt înrudite, va exista, fără îndoială, o oarecare omologie între cromozomii *a și b.* Alopoliploizii sunt rari la majoritatea animalelor, deoarece comportamentul de împerechere este aproape întotdeauna specific speciei, ceea ce face ca etapa inițială de hibridizare să fie destul de improbabilă.

Un exemplu clasic de amfidiploidie la plante este specia cultivată de bumbac american, *Gossypim* (Figura 8.9). Această specie are 26 de perechi de cromozomi: 13 sunt mari, iar celelalte 13 sunt mult mai mici. Când s-a descoperit că bumbacul din Lumea Veche avea doar 13 perechi de cromozomi mari, s-a suspectat alopoliploidia. Când bumbacul sălbatic american a fost examinat și s-a constatat că are 13 perechi de cromozomi mici, această suspiciune a fost întărită. J.O. Beasley a reușit să reconstituie experimental originea bumbacului cultivat prin încrucișarea soiului din Lumea Veche cu soiul sălbatic american și apoi tratarea hibridului cu colchicină pentru a dubla numărul de cromozomi. Rezultatul acestor tratamente a fost un soi de bumbac amfidiploid fertil. Acesta avea 26 de perechi de cromozomi și caracteristici similare cu soiul cultivat.

Amfidiploidele prezintă adesea caracteristici ale ambelor specii-mamă. Un exemplu interesant, deși fără aplicații economice practice, este hibridul format între ridiche *(Raphanus sativus)* și varză *(Brassica oleracea).* Ambele specii au un număr haploid de *n* = 9. Hibridul inițial este format din nouă cromozomi de la *Raphanus* și nouă de la *Brassica* (9R + 9B). Deși hibrizii sunt aproape întotdeauna sterili, au fost produși câțiva amfidiploizi fertili (18R + 18B). Din păcate, rădăcina acestei plante este mai asemănătoare cu cea a verzei, iar lăstarii ei sunt mai asemănători cu cei ai ridichii. Dacă ar fi fost adevărat contrariul, hibridul ar fi putut fi important din punct de vedere economic.

O metodă de hibridizare comercială mult mai eficientă a fost realizată folosind două tipuri de graminee, grâul și secara. Grâul (genul *Triticum)* are un genom haploid de bază

FIGURA 8.9 Cápsulas de una forma anfidiploide de *Cossypium,* la planta de algodón cultivada americana.

format din șapte cromozomi. Pe lângă diploizii normali (2n = 14), există autopoliploizi cultivați, cum ar fi tetraploizii (4n = 28) și hexaploizii (6n = 42). Secara (genul *Secale)* are, de asemenea, un genom format din șapte cromozomi. Singura specie cultivată de secară este planta diploidă *(2n* = 14).

Folosind tehnica descrisă în Figura 8.8, geneticienii au produs mai mulți hibrizi. Atunci când grâul tetraploid este încrucișat cu secară diploidă, iar plantele F1 sunt tratate cu colchicină, se obține o varietate hexaploidă (6n = 42); acest hibrid, numit *Triticale,* reprezintă un gen nou. Soiurile hibride fertile derivate din diverse specii de grâu și secară pot fi încrucișate sau retroîncrucișate. Aceste încrucișări au dus la numeroase varietăți din genul Triticale . Plantele hibride prezintă caracteristici atât ale grâului, cât și ale secarei. De exemplu, anumiți hibrizi combină conținutul ridicat de proteine al grâului cu conținutul ridicat de lizină al secarei (conținutul de lizină al grâului este scăzut, ceea ce îi limitează valoarea nutritivă). Grâul este considerat o iarbă cu randament ridicat, în timp ce secara este remarcabilă pentru versatilitatea sa în creșterea în condiții nefavorabile. Speciile de Triticale , Soiurile care combină ambele caracteristici au potențialul unei creșteri semnificative a producției de cereale . Programe concepute pentru îmbunătățirea recoltelor prin hibridizare sunt în desfășurare de ceva vreme în mai multe țări în curs de dezvoltare .

Endopoliploidie

Endopoliploidia este afecțiunea în care doar anumite celule ale unui organism diploid sunt poliploide . În astfel de celule, seturile de cromozomi sunt replicate în mod repetat fără diviziune nucleară. Numeroase exemple de endopoliploidie au fost observate în natură. De exemplu, nucleii celulelor hepatice la vertebrate , inclusiv la oameni, au adesea seturi de cromozomi de 4n, 8n sau 16n. Țesutul stem și parenchimatos al regiunilor apicale ale plantelor cu flori prezintă, de asemenea, frecvent endopoliploidie. Celulele care căptușesc intestinul larvelor de țânțari ating o ploidie de 16n, dar în timpul stadiilor de pupă, aceste celule suferă diviziuni reducționale foarte rapide, rezultând celule diploide mai mici. La *Gerris, un animal de vânătoare de apă,* o mare varietate de numere de cromozomi se găsește în diferite țesuturi, ajungând până la 1.024 sau 2.048 de copii ale fiecărui cromozom în celulele glandelor salivare. Deoarece numărul diploid de cromozomi din acest organism este 22, nucleii acestor celule pot conține peste 40.000 de cromozomi.

Deși rolul endopoliploidiei este neclar, proliferarea copiilor cromozomiale apare adesea în celulele în care este necesară o producție ridicată a anumitor produse genetice. De fapt, s-a demonstrat clar că anumite gene, ale căror produse sunt necesare în cantități mari în *fiecare* celulă, se găsesc în mod natural în genom în copii multiple. Genele ARN ribozomale și de transfer sunt exemple de gene cu copii multiple. În anumite celule ale organismelor, unde nici măcar această situație nu permite o cantitate suficientă dintr-un anumit produs genetic, poate fi necesară replicarea întregului genom, permițând o rată și mai mare de exprimare a genei respective.

ACUM REZOLVĂ ASTA

8.2 Când două plante din specii diferite, dar aparținând aceluiași gen, au fost încrucișate, hibrizii F1 au fost mai viabili și au avut flori mai ornamentate. Din păcate , acest hibrid a fost steril și a putut fi propagat doar prin altoire vegetativă. Explicați sterilitatea hibridului și ce ar trebui să se întâmple pentru ca această sterilitate să dispară.

SUGESTIE: *Această problemă implică înțelegerea a ceea ce sunt plantele alopolipoide. Cheia rezolvării ei este concentrarea asupra originii și compoziției cromozomilor hibridului și reflectarea asupra modului în care aceștia ar putea fi manipulați.*

8.4

Apar variații în structura și aranjamentul cromozomilor

Al doilea tip de aberație cromozomială include modificări care elimină, adaugă sau rearanjează porțiuni substanțiale ale unuia sau mai multor cromozomi. Această categorie largă include deleții și duplicări ale genelor sau părților unui cromozom și rearanjări ale materialului genetic în care segmente ale unui cromozom sunt inversate , schimbate cu un segment al unui cromozom neomolog sau pur și simplu transferate pe un alt cromozom. Schimburile și transferurile se numesc *translocații ,* în care locațiile genelor sunt modificate în cadrul genomului . Figura 8.10 ilustrează aceste tipuri de modificări cromozomiale.

În majoritatea cazurilor , aceste modificări structurale rezultă din una sau mai multe rupturi distribuite de-a lungul axei cromozomilor , urmate de pierderea sau rearanjarea materialului genetic. Cromozomii se pot rupe spontan, dar rata de rupere poate crește în celulele expuse la substanțe chimice sau radiații. Deși capetele normale ale cromozomilor, telomerii , nu se unesc ușor cu capete noi.

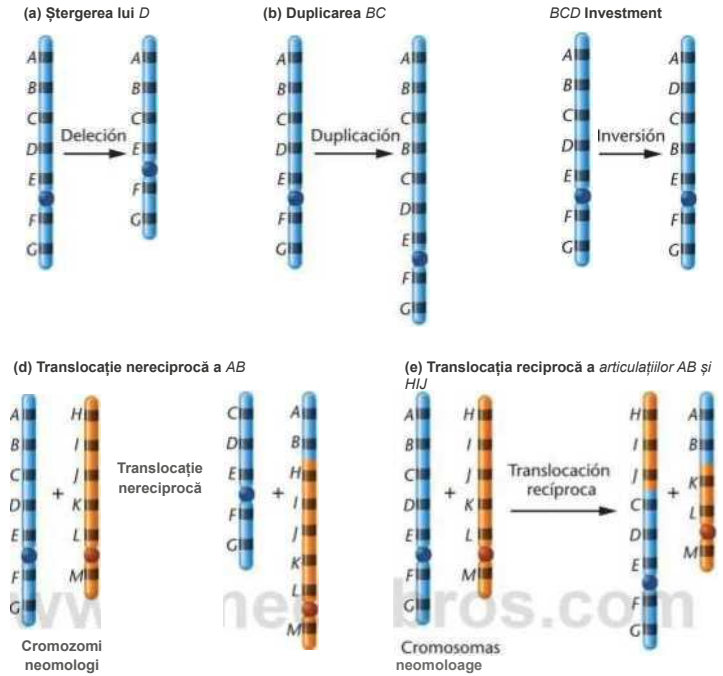


FIGURA 8.10 Prezentare generală a celor cinci tipuri diferite de câștig, pierdere sau rearanjare a segmentelor cromozomiale.

În cromozomii cu telomeri „rupți" sau alterați, capetele produse la punctele de ruptură sunt „lipicioase" și se pot reunifica cu alte capete rupte. Dacă ruperea și reunificarea ulterioară nu restabilesc relațiile originale și dacă modificarea are loc în celulele germinale, gameții vor prezenta o rearanjare structurală, care va fi ereditară.

Dacă aberația se găsește la un omolog, dar nu la celălalt, se spune că indivizii sunt *heterozigoți pentru aberație.* În astfel de cazuri, în timpul sinapsei meiotice se formează configurații de împerechere rare, dar caracteristice. Aceste modele sunt utile pentru identificarea tipului de modificare care a avut loc. Dacă nu există nicio pierdere sau câștig de material genetic, indivizii purtători ai aberației în heterozigoție probabil nu vor fi afectați în fenotipul lor. Cu toate acestea, împerecherile complexe ale acestor aranjamente duc adesea la gameți cu duplicații sau deficiențe ale unor regiuni cromozomiale. Când se întâmplă acest lucru, urmașii purtătorilor anumitor aberații au adesea o probabilitate mai mare de a prezenta modificări fenotipice.

O deleție este pierderea unei regiuni a unui cromozom

Când un cromozom se rupe la unul sau mai multe locuri și o porțiune din acesta se pierde , piesa lipsă se numește deleție (sau deficiență). Ștergerea poate apărea în apropierea unui capăt sau în interiorul cromozomului. Acestea se numesc deleții terminale sau interstițiale , respectiv [Figura 8.11(a) și (b)]. Porțiunea cromozomului care păstrează regiunea centromerică va fi în mod normal menținută - atunci când celula se divide, în timp ce segmentul fără centromer se va pierde în cele din urmă în celulele fiice după mitoză sau meioză. Când are loc sinapsa între un cromozom cu o deficiență interstițială mare și un omolog normal complet, regiunea nepereche a omologului normal formează o buclă numită buclă de deleție sau buclă compensatorie [Figura 8.11 (c)].

Dacă doar o mică parte a unui cromozom este ștearsă , organismul poate supraviețui. Totuși, dacă partea

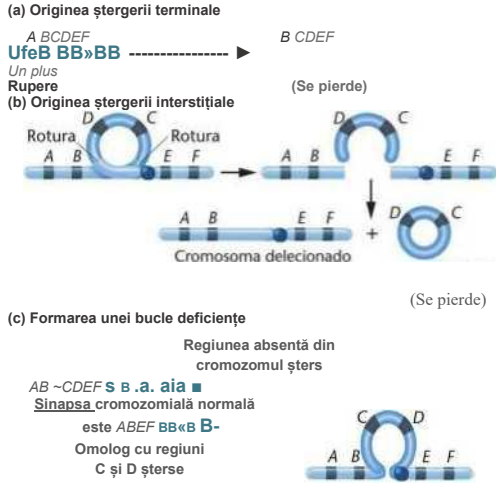


FIGURA 8.11 Originea unei deleții (a) terminale și (b) interstițiale. În partea (c), există o împerechere între un cromozom normal și unul cu o deleție interstițială, cu formarea unei bucle a regiunii nedelete, rezultând o buclă de deficiență (sau de compensare).

Ștergerea unui cromozom nu trebuie să fie foarte mare pentru ca efectele să fie severe. Vom vedea un exemplu în acest sens în următoarea discuție despre sindromul cri *du chat* la om. Dacă se pierd și mai multe informații genetice ca urmare a unei deleții, aberația este adesea letală , caz în care mutația cromozomială nu este niciodată disponibilă pentru studiu.

Sindromul Cri-du-chat la om

La om , sindromul Cri du Chat , sau sindromul Lejeune, rezultă din deleția unei mici porțiuni terminale a cromozomului 5. Poate fi considerat un caz de monosomie parțială, dar deoarece regiunea lipsă este atât de mică , este mai potrivit să o considerăm o deleție segmentară . Acest sindrom a fost caracterizat pentru prima dată de Jérôme Lejeune în 1963 , când a descris simptomele clinice , inclusiv un țipăt ciudat similar cu mieunatul unei pisici , de unde și numele sindromului . Acest sindrom este asociat cu pierderea unei porțiuni mici și variabile a brațului scurt al cromozomului 5 (Figura 8.12). Prin urmare , constituția genetică poate fi desemnată ca 46, 5p-, ceea ce înseamnă că individul are 46 de cromozomi , dar lipsește o parte sau tot brațul p (brațul scurt) al unuia dintre membrii perechii cromozomului 5 .

Copiii cu acest sindrom pot prezenta malformații anatomice, inclusiv complicații gastrointestinale și cardiace , și sunt adesea cu dizabilități intelectuale. Dezvoltarea anormală a glotei și laringelui (care provoacă plânsul caracteristic) este tipică pentru acest sindrom .

Din 1963, sute de cazuri de sindrom Cri du Chat au fost raportate la nivel mondial . Incidența este estimată la 1 la 25.000–50.000 de nou -născuți vii . Cel mai adesea, această afecțiune nu este moștenită, ci rezultă din pierderea sporadică de material cromozomial din gameți. Lungimea brațului scurt care este șters variază oarecum; ștergerile mai lungi par să aibă un impact mai mare asupra abilităților fizice, psihomotorii și mentale ale copiilor supraviețuitori. Deși efectele sindromului sunt severe , majoritatea persoanelor afectate dezvoltă abilități

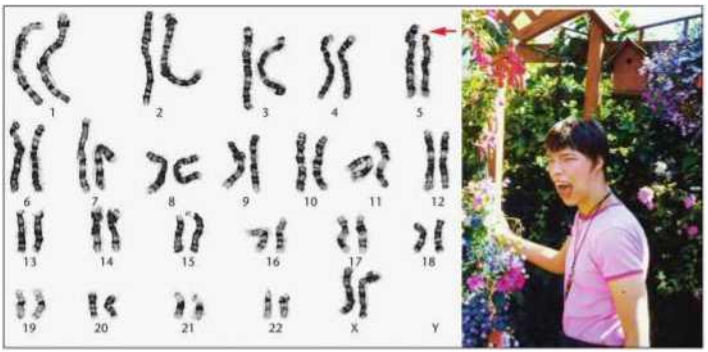


FIGURA 8.12 Un cariotipo representativo y una fotografía de una niña con síndrome del maullido de gato (46,5p -). En el cariotipo, la flecha identifica la ausencia de una pequeña parte del brazo corto de uno de los homólogos del cromosoma 5.

motorii și verbale și pot fi îngrijite acasă . În 2004, s-a raportat că porțiunea lipsă a cromozomului conține gena *TERT* , care codifică transcriptaza inversă a telomerazei , o enzimă esențială pentru menținerea telomerilor în timpul replicării ADN-ului (vezi Capitolul *11*). *Încă* nu se știe dacă absența acestei gene la unul dintre omologi este legată de fenotipurile multiple pe care le prezintă copiii cu sindrom Cri du Chat.

8.6

O duplicație este un segment cromozomial repetat

Când orice parte a materialului genetic - un locus sau un fragment mare de cromozom - este prezentă de mai multe ori în genom, ne referim la aceasta ca o duplicație. Ca și în cazul deleților, împerecherea la indivizii heterozigoți poate duce la o buclă compensatorie . Duplicațiile pot apărea ca urmare a încrucișării inegale între cromozomi în sinapsis în timpul meiozei (Figura 8.13) sau dintr-o eroare de replicare înainte de meioză . În primul caz, apar atât duplicări, cât și deficiențe.

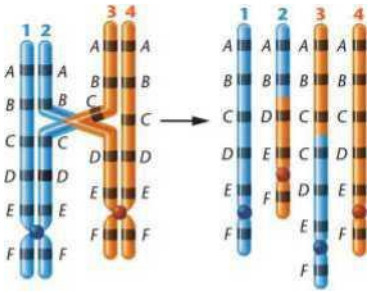


FIGURA 8.13 Originea regiunilor cromozomiale duplicate și deficitare ca o consecință a încrucișării inegale. Tetrada din stânga este nepotrivită la sinapsă . Încrucișarea între cromatidele 2 și 3 are ca rezultat regiuni cromozomiale deficitare și duplicate. *(Vezi cromozomii 2 și 3, respectiv, în dreapta.) Cei doi cromozomi care nu sunt implicați* în încrucișare rămân normali în ceea ce privește conținutul și secvența genelor.

Vom analiza trei aspecte interesante ale duplicărilor . În primul rând, acestea pot duce la redundanță genetică. În al doilea rând, la fel ca delețiile , duplicările pot duce la variații ale fenotipului. În al treilea rând, conform unei teorii larg acceptate , duplicările au fost, de asemenea, o sursă importantă de variabilitate genetică în evoluție .

Redundanță și amplificare genetică: gene ARN ribozomal

Duplicarea segmentelor cromozomiale are capacitatea de a amplifica numărul de copii ale genelor individuale existente. Acest lucru s-a întâmplat în mod clar cu gena care codifică ARN -ul ribozomal , care trebuie să fie prezentă în abundență în ribozomii tuturor celulelor pentru a efectua sinteza proteinelor . Am putea emite ipoteza că existența unei singure copii a genei care codifică ARN-ul ribozomal ar fi inadecvată în multe celule cu activitate metabolică intensă . Studiile care aplică tehnici de hibridizare moleculară , care ne permit să determinăm procentul din genom care codifică secvențe specifice de ARN , demonstrează că ipoteza - noastră este corectă. De fapt, este normal ca organismele să aibă copii multiple ale genelor care codifică ARN-ul. Un astfel de ADN se numește ADNr, iar fenomenul general se numește redundanță genetică. De exemplu, la bacteria intestinală *Escherichia coli (E. coli)* Aproximativ 0,7 % din genomul haploid este ADNr - echivalentul a șapte copii ale genei . La *Drosophila melanogaster,* 0,3 % din genomul haploid este ARNr, ceea ce este echivalentul a 130 de copii ale genei . Deși prezența mai multor copii ale aceleiași gene nu se limitează la cele care codifică ARNr, în această secțiune ne vom concentra exclusiv asupra acestor gene.

Interesant este că , în unele celule, în special în ovocite , chiar și redundanța normală a ARNr este insuficientă pentru a furniza cantități adecvate de ARNr pentru construirea ribozomilor. Ovocitele stochează mulți nutrienți, inclusiv cantități enorme de ribozomi , pentru a fi utilizați de către embrion în primele etape ale dezvoltării. De fapt, ovocitele acumulează mai mulți ribozomi decât orice alt tip de celulă . Examinând modul în care amfibianul *Xenopus laevis* dobândește această abundență de ribozomi, vom explora o a doua modalitate prin care ARNr poate fi crescut . Acest fenomen se numește amplificare genică.

Genele care codifică ARNr sunt situate într -o regiune cromozomială numită regiunea organizatoare nucleolară (NOR). NOR este strâns asociată cu nucleolul, care este un centru de procesare pentru producerea de ribozomi . Analizele de hibridizare moleculară

au arătat că fiecare NOR din broasca *Xenopus* conține echivalentul a 400 de copii redundante de gene care codifică ARNr . Chiar și acest număr de gene este aparent inadecvat pentru a sintetiza numărul enorm de ribozomi care trebuie să se acumuleze în ovocitul amfibian pentru a susține dezvoltarea după fertilizare.

Pentru a amplifica și mai mult numărul de gene ARNr, ADNr este replicat selectiv, iar fiecare grup nou de gene se separă de șablonul său. Deoarece fiecare copie nouă este echivalentă cu un ÑOR, în ovocit se formează mai mulți nucleoli mici. Până la 1.500 dintre acești „micronucleoli" au fost observați într-un singur *ovocit de Xenopus.* Înmulțirea numărului de micronucleoli (1.500) cu numărul de copii genetice din fiecare ÑOR (400) arată că amplificarea în ovocitele *de Xenopus* poate duce la peste o jumătate de milion de copii genetice. Dacă fiecare copie este transcrisă de doar 20 de ori în timpul maturării ovocitelor, teoretic, vor fi produse suficiente copii de ARNr pentru a da naștere la peste 12 milioane de ribozomi.

Mutația Bar la *Drosophila*

Duplicațiile pot duce la modificări ale fenotipului care, la prima vedere, ar putea părea cauzate de o simplă mutație genetică. Fenotipul cu ochi *de bară* al *Drosophilei* (Figura 8.14) este un exemplu clasic. În loc de ochiul oval obișnuit, musculițele *Bar* au ochi înguști, asemănători unor bare. Acest fenotip pare a fi moștenit ca o mutație dominantă legată de cromozomul X.

La începutul anilor 1920, Alfred H. Sturtevant și Thomas Morgan au descoperit și investigat această „mutație". Femelele normale de tip sălbatic *(B*/B*)* au aproximativ 800 de fațete în fiecare ochi. Femelele heterozigote (B/B^{+}) au aproximativ 350 de fațete, în timp ce femelele homozigote (B/B) au, în medie, doar aproximativ 70 de fațete. Ocazional, au fost găsite femele cu un număr și mai mic de fațete; acestea au fost desemnate ca *Bar dublu* $(BnIB^{-})$.

Aproximativ zece ani mai târziu, Calvin Bridges și Herman J. Muller au comparat modelul de bandare al cromozomilor X politeni la musculițele *Bar* cu cel al musculițelor de tip sălbatic. Acești cromozomi conțin modele specifice de bandare care au fost clasificate în funcție de regiunile concretizate ale cromozomului. Studiile lui Bridges și Muller au arătat că exista o copie a regiunii desemnate ca 16A pe ambii cromozomi X ai musculițelor de tip sălbatic și că această regiune era duplicată la *musculițele Bar și* triplicată la *musculițele Bar duble.* Aceste observații au furnizat dovezi că fenotipul *Bar* nu este rezultatul unei simple modificări chimice a unei gene, ci mai degrabă al unei duplicări.

Rolul duplicărilor genice în evoluție

Atunci când studiem evoluția, unul dintre cele mai interesante aspecte este speculareа asupra posibilelor mecanisme ale variației genetice. Originea produselor genetice unice prezente în organismele evoluate mai recent și care nu se regăsesc în formele ancestrale, este un subiect de interes deosebit. Cu alte cuvinte, cum apar genele „noi"? După cum vom vedea, există o ipoteză conform căreia procesul de duplicare a genelor este principala sursă de noi gene, așa cum a fost propus în 1970 de Susumu Ohno în controversata sa monografie, **Evoluție prin duplicare a genelor*.* Teza lui Ohno se bazează pe presupunerea că produsele multor gene, prezente ca copii unice în genom, sunt esențiale pentru supraviețuirea membrilor oricărei specii în timpul evoluției. Prin urmare, genele individuale nu sunt susceptibile de a acumula suficiente mutații pentru a-și altera funcția primară și a da naștere la noi gene.

Totuși, dacă o genă esențială ar fi duplicată în linia germinală, copia suplimentară ar tolera modificări mutaționale semnificative în generațiile viitoare, deoarece gena originală furnizează informațiile genetice necesare funcției sale esențiale. Copia duplicată ar fi liberă să dobândească numeroase modificări mutaționale pe perioade lungi de timp. În perioade scurte, noua informație genetică ar putea să nu aibă niciun avantaj practic. Cu toate acestea, pe perioade lungi de evoluție, gena duplicată s-ar putea schimba suficient.

AGURA 8.14 Fenotipos de ojo *Bar* y de tipo silvestre en *Drosophila.*

Variación en el número de copias (CNV). Duplicaciones y deleciones a nivel molecular

Las investigaciones genómicas que se centran en la duplicación o deleción de secuencias de ADN en la especie humana están proporcionando nuevos datos para permitirnos comprender esas duplicaciones y deleciones. Estas variantes, que a menudo implican miles de pares de bases, puede resultar que jueguen un papel crucial en muchas de nuestras características individuales, cómo nuestra sensibilidad a los medicamentos y la susceptibilidad a las enfermedades, Estas diferencias, debido a que representan *diferencias cuantitativas en el número de grandes secuencias de ADN,* se denominan variaciones en el número de copias (CNV) y se encuentran tanto en las regiones codificantes del genoma como en las no codificantes.

En 2004, dos grupos de investigación describieron de manera independiente la presencia de variaciones CNV en los genomas de individuos sanos que no padecían ningún trastorno genético conocido. Las variantes CNV se definieron inicialmente como regiones de ADN de al menos 1 kb de longitud (1.000 pares de bases) que muestran al menos un 90 por ciento de identidad en la secuencia. Este estudio inicial detectó 50 loci compuestos de CNV y en 2005 varios otros grupos comenzaron a analizar el genoma en busca de variaciones CNV, consiguiendo definir casi 300 sitios adicionales. El número actual de sitios CNV, cuando ampliamos la definición para abarcar secuencias de ADN de al menos 500 pares de bases, se estimó en 2010 que estaba por encima de las 10.000 regiones, representando una parte sustancial de la variabilidad genética total en los seres humanos.

Los estudios actuales sobre CNV se han centrado en encontrar asociaciones con trastornos humanos. Los sitios CNV parecen tener tanto asociaciones positivas como negativas con muchas enfermedades en las que la base genética todavía no se comprende del todo. Por ejemplo, se ha informado de una asociación entre sitios CNV y el autismo, un desorden neurológico del desarrollo que afecta a la comunicación, al comportamiento y a la interacción social de los afectados. Un dato interesante es que se ha detectado que aparece un sitio CNV mutante *de novo* (nuevo) en el 10 por ciento de los denominados casos esporádicos de autismo, en los que los padres no afectados carecen de esa mutación CNV. Esto contrasta con el escueto 2 por ciento de individuos afectados en los que la enfermedad parece ser familiar (exhibida por diversos miembros de la familia). De forma similar, un número de copias del gen *CCL3L1* superior a la media confiere un efecto supresor del VIH durante la infección vírica, ralentizando la progresión del SIDA. Otro grupo de investigación ha asociado sitios CNV mutantes específicos con ciertos subconjuntos de poblaciones humanas que padecen cáncer de pulmón —cuanto mayor es el número de copias del gen *EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor,* Receptor del factor de crecimiento epidérmico), más responden al tratamiento los pacientes con un cáncer pulmonar de células no pequeñas. Por último, cuanto mayor es la reducción en el número de copias del gen designado como *DEFB,* mayor es el riesgo de desarrollar la enfermedad de Crohn, una trastorno que afecta al colon. En lo que respecta a este capítulo, estos hallazgos revelan que las duplicaciones y deleciones no están en modo alguno restringidas a los ejemplos típicos de libro de texto de estas mutaciones cromosómicas.

funcție ar putea oferi organismului un avantaj „adaptiv", sporindu-i adaptarea biologică. Ohno a subliniat un mecanism prin care s-ar fi putut forma variabilitatea genetică susținută.

lui Ohno este susținută de descoperirea unor gene care au în comun o porțiune semnificativă a secvențelor lor de ADN, dar ale căror produse genetice diferă. De exemplu, genele care codifică enzimele digestive *tripsină* și *chimotripsină* se încadrează în această descriere, la fel ca și cele care codifică moleculele respiratorii *mioglobină* și diferitele forme de *hemoglobină.* Putem concluziona că aceste gene au provenit dintr-o genă ancestrală comună prin - duplicație. De-a lungul evoluției, genele înrudite au divergit suficient pentru ca produsele lor să devină distincte.

O susținere suplimentară pentru această teorie vine din prezența familiilor de gene , grupuri de gene adiacente ale căror produse îndeplinesc aceeași funcție. Din nou, membrii unei familii prezintă suficientă omologie în secvența lor de ADN pentru a concluziona că au o origine comună. Exemplele includ diferitele tipuri de lanțuri polipeptidice din hemoglobina umană, precum și receptorii și antigenii celulelor T , de mare importanță imunologică, codificați de complexul major de histoincompatibilitate .

IS

Reorganizarea investițiilor secvența liniară a genelor

O inversiune, un alt tip de variație structurală, este o aberație cromozomială în care un segment al unui cromozom este rotit cu 180° asupra sa. O inversiune nu implică o pierdere a informației genetice, ci

pur și simplu o rearanjare liniară a secvenței genetice . O inversiune necesită două rupturi și reinserția ulterioară a segmentului inversat. Figura 8.15 ilustrează modul în care poate apărea o inversiune. Formând o buclă cromozomială înainte de ruptură, capetele „lipicioase" nou create se apropie unul de celălalt și se reunesc.

Segmentul inversat poate fi scurt sau foarte lung și poate include sau nu centromerul. Dacă centromerul nu face parte din segmentul cromozomial rearanjat, se numește inversiune paracentrică. Dacă centromerul face parte din segmentul inversat, se descrie ca inversiune pericentrică , care este tipul prezentat în Figura 8.15.

Deși inversiunile pot părea să aibă un impact minim asupra indivizilor care le poartă, consecințele lor sunt de mare interes pentru geneticieni. Organismele heterozigote pentru inversiuni pot produce gameți aberanți cu un impact semnificativ asupra urmașilor lor.

Consecințele investițiilor în formarea gameților

Dacă doar un membru al unei perechi de cromozomi omologi are un segment inversat, sinapsa liniară normală nu este posibilă în timpul meiozei. Organismele cu un cromozom inversat și omologul neinversat se numesc heterozigote datorită inversiunii. Împerecherea în timpul meiozei între astfel de cromozomi poate - avea loc numai dacă se formează o buclă de inversie (Figura 8.16).

Dacă nu are loc nicio încrucișare în segmentul inversat al buclei de inversie, omologii se vor segrega, rezultând două cromatide normale și două cromatide inversate, care vor fi distribuite în gameți. Cu toate acestea, dacă are loc încrucișarea în bucla de inversie, se vor produce cromatide anormale. Efectul unui singur eveniment de încrucișare în cadrul unei inversiuni paracentrice este ilustrat în Figura 8.16(a).

Ca în orice tetradă meiotică, o simplă încrucișare între cromatide non-surori produce două cromatide parentale și două cromatide recombinante . Cu toate acestea, atunci când încrucișarea are loc în cadrul unei inversiuni paracentrice , se produc o cromatidă dicentrică recombinantă (cu doi centromeri) și o cromatidă acentrică (căreia îi lipsește un centromer) . Ambele prezintă, de asemenea, duplicări și deleții de segmente cromozomiale . În timpul anafazei , o cromatidă acentrică se mișcă aleatoriu spre un pol sau altul sau se poate pierde, în timp ce o cromatidă dicentrică este trasă spre ambii poli. Această mișcare polarizată are ca rezultat punți dicentrice, care pot fi recunoscute otologic. O cromatidă dicentrică se va rupe de obicei la un moment dat , așa că în diviziunea reducțională , o parte din cromatidă merge la un gamet și o parte la altul. Prin urmare , gameții vor avea oricare dintre cele două cromatide rupte, care prezintă deficiențe de material genetic . Când unul dintre acești gameți participă la fertilizare, zigotul se dezvoltă de obicei anormal , dacă se dezvoltă deloc.

Ca o consecință a încrucișării dintre o cromatidă cu o inversiune pericentrică și omologul său neinversat , apare un dezechilibru cromozomial similar , așa cum este ilustrat în Figura 8.16(b). Cromatidele recombinante implicate direct în schimb prezintă duplicări și deleții. La plante, gameții care primesc astfel de cromatide aberante nu se dezvoltă de obicei corect, rezultând polen sau ovule avortate . Astfel, letalitatea apare înainte de fertilizare și se produc semințe neviabile . La animale, gameții s-au dezvoltat înainte de eroarea meiotică , așa că fertilizarea este mai probabilă în ciuda erorii cromozomiale. Cu toate acestea , rezultatul final după fertilizare este producerea de embrioni neviabil . În ambele cazuri, viabilitatea este redusă.

Întrucât nu apar urmași viabili nici la plante , nici la animale , *se pare* ca și cum investițiile ar suprima încrucișarea . În realitate ,

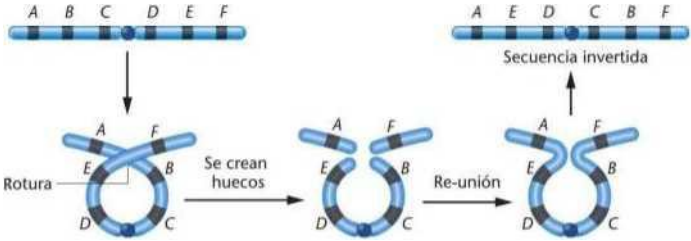


FIGURA 8.15 Un posible origen de una inversión pericéntrica.

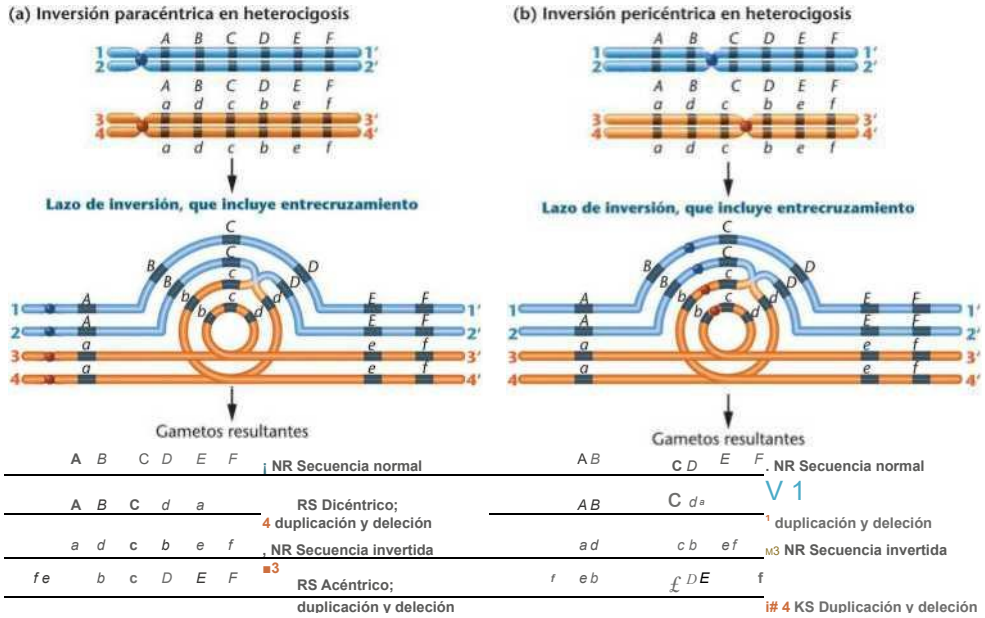


FIGURA 8.16 (a) Efectos de un entrecruzamiento sencillo (RS) dentro de un lazo de inversión en un heterocigoto con inversión paracéntrica, en el que se producen dos cromosomas modificados, uno acéntrico y otro dicéntrico. Ambos cromosomas contienen también regiones duplicadas y deficientes, (b) Efectos de un entrecruzamiento en un heterocigoto con inversión pericéntrica, en el que se producen dos cromosomas modificados, ambos con regiones duplicadas y deficientes.

la indivizi

La heterozigoții care suferă de inversie, inversia are efectul de a *suprima recuperarea produselor recombinante* atunci când schimbul cromozomial are loc în regiunea inversată. Dacă încrucișarea s-ar produce întotdeauna în cadrul unei inversiuni pericentrice sau paracentrice, 50% dintre gameți ar fi ineficienți. Prin urmare, viabilitatea zigoților rezultați ar fi mult redusă. În plus, jumătate dintre gameții viabili poartă cromozomul cu inversie, iar inversia se va perpetua în specie. Ciclul se va repeta continuu în timpul meiozei în generațiile viitoare.

Avantajele evolutive ale investițiilor

Deoarece recuperarea produselor recombinante este suprimată la indivizii heterozigoți pentru o inversiune, grupurile alele specifice din locusurile adiacente din cadrul inversiunii pot fi conservate de la o generație la alta. Dacă alelele genelor implicate oferă un avantaj de supraviețuire pentru organismele care le mențin, inversiunea va fi benefică pentru supraviețuirea evolutivă a speciei. De exemplu, dacă grupul alel *ABCDef* este mai adaptiv decât grupurile *AbCdeF* sau *abcdEF,* gameții eficienți vor conține acest grup genetic, neafectat de încrucișare.

studiile de laborator , același principiu este aplicat folosind cromozomi echilibratori care conțin inversiuni. Când un organism este heterozigot pentru un cromozom echilibrator, secvențele alele dorite sunt păstrate în timpul lucrărilor experimentale.

ACUM REZOLVĂ ASTA

8.3 Care este efectul unei încrucișări duble rare (a) în cadrul unui segment cromozomial care este heterozigot pentru o inversiune pericentrică și (b) în cadrul unui segment care este heterozigot pentru o inversiune paracentrică?

- **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea modului în care cromozomii omologi fac sinapsă în prezența unei inversiuni heterozigote, precum și conștientizarea distincției dintre inversiunile pericentrice și paracentrice . Cheia rezolvării acesteia este desenarea tetradei și urmărirea aranjamentului cromatidelor care suferă o dublă încrucișare.*

8.8

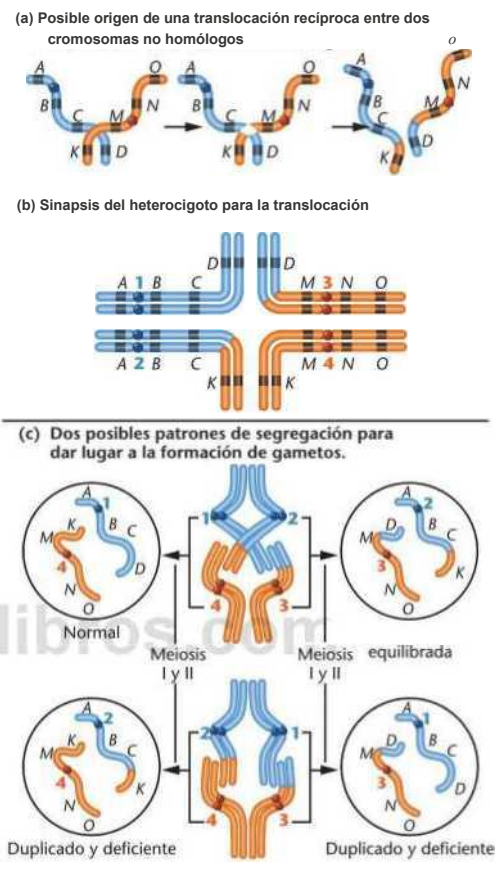
Translocațiile modifică amplasarea segmentelor cromozomiale în genom

Translocația , așa cum sugerează și numele, este deplasarea unui segment de cromozom către o nouă locație în genom . De exemplu, schimbul de segmente între doi cromozomi neomologi este o translocație reciprocă. Cea mai ușoară modalitate prin care se poate produce acest lucru este ca brațele a doi cromozomi neomologi să se apropie unul de celălalt astfel încât să faciliteze schimbul . Figura 8.17 (a) ilustrează o translocație reciprocă simplă în care sunt necesare doar două rupturi. Dacă schimbul implică segmente interne de cromozomi, sunt necesare patru rupturi, câte două pe fiecare cromozom.

Consecințele genetice ale translocațiilor reciproce sunt, în mai multe privințe, similare cu cele ale inversiunilor. De exemplu, nu există nicio pierdere sau câștig de informație genetică. În schimb , are loc doar o rearanjare a materialului genetic . Prin urmare, prezența unei translocații nu afectează direct viabilitatea indivizilor care o poartă.

Cromozomii omologi care sunt heterozigoți pentru o - translocație reciprocă suferă sinapse neortodoxe în timpul meiozei. După cum se arată în Figura 8.17(b), împerecherea are ca rezultat o configurație cruciformă. Ca și în cazul inversiunilor, gameții dezechilibrați genetic sunt produși și în meioză, ca o consecință a acestei alinieri neobișnuite. Cu toate acestea, în cazul translocațiilor , gameții aberanți nu sunt neapărat rezultatul încrucișării. Pentru a vedea cum se produc gameții dezechilibrați, să ne uităm la centromerii omologi din Figura 8.17(b) și (c). Conform principiului asortării independente , cromozomul cu centromerul 1 va migra aleatoriu către un pol al fusului de diviziune în prima anafază meiotică; *fie se va* deplasa odată cu cromozomul cu centromerul 3, fie ... cu cromozomul care are centromerul 4. Cromozomul cu centromerul 2 se va deplasa la celălalt pol, *fie* cu cromozomul care are centromerul 3 , *fie* cu cromozomul care are centromerul 4*. Acest lucru va duce la patru produse meiotice posibile . Combinațiile 1, 4 are cromozomi care nu sunt implicați în translocație și sunt normali. Cu toate acestea, combinațiile 2, 3 au cromozomi translocați, dar aceștia au un set complet de informații genetice și sunt echilibrați. Când se obține acest rezultat [configurația de sus a Figurii 8.17(c)] , modelul de segregare din prima diviziune meiotică este cunoscut sub numele de segregare - alternantă . Un al doilea model [configurația de jos a Figurii 8.17(c)] produce celelalte două produse potențiale : combinațiile 1, 3 și 2, 4, care au cromozomi

cu segmente duplicate și deleții. Acest model se numește segregare adiacentă-1. Rețineți că nu am inclus în figură un al treilea tip de aranjament, în care centromerii omologi se segregă spre același pol în timpul meiozei (un model numit *segregare adiacentă-2).* Acest tip de segregare are un rezultat similar cu segregarea adiacentă-1, cu produse meiotice care conțin material cromozomial duplicat și


(a) Posible origen de una translocación recíproca entre dos cromosomas no homólogos
(b) Sinapsis del heterocigoto para la translocación
(c) Dos posibles patrones de segregación para dar lugar a la formación de gametos.
Normal
Meiosis I y II
Meiosis I y II
equilibrada
Duplicado y deficiente
Duplicado y deficiente

RGURA 8.17 (a) Posible origen de una translocación recíproca, (b) Configuración sinóptica formada durante la meiosis en un individuo que es heterocigótico para la translocación, (c) Dos posibles patrones de Segregación, Uno que da lugar a un gameto normal y otro desequilibrado (llamada segregación alternante) y otro que da lugar a gametos que tienen duplicaciones *y* deficiencias (llamada segregación adyacenre-1).

decheionat care este dezechilibrat genetic.

Când gameții dezechilibrați genetic participă la fertilizare la speciile animale, urmașii rezultați rareori supraviețuiesc. Mai puțin de 50% dintre urmașii părinților heterozigoți pentru o translocație reciprocă supraviețuiesc. Această afecțiune la unul dintre părinți se numește semisterilitate, iar impactul său asupra succesului reproductiv al organismelor joacă un rol în evoluție. La oameni, acest dezechilibru are ca rezultat trisomia sau monosomia parțială, ceea ce duce la diverse malformații congenitale.

Translocații la specia umană: sindromul Down familial

Cercetările efectuate din 1959 au relevat o serie de translocații la indivizi din populațiile umane. Un tip comun de translocație implică rupturi la capetele brațelor scurte a doi cromozomi acrocentrici neomologi. Aceste fragmente mici se pierd, iar segmentele cromozomiale mari fuzionează la nivelul regiunilor lor centromerice. Acest tip de translocație produce un nou cromozom submetacentric sau metacentric de dimensiuni mari și este adesea numit translocație robertsoniană.

O astfel de translocație este responsabilă pentru cazurile familiale în care sindromul Down este moștenit. La începutul acestui capitol, am observat că majoritatea cazurilor de sindrom Down se datorează trisomiei 21. Acest aranjament cromozomial rezultă din non-disjuncția în timpul meiozei la unul dintre părinți. Trisomia reprezintă 95% din toate cazurile de sindrom Down. În astfel de situații, probabilitatea ca aceiași părinți să aibă un al doilea copil afectat este extrem de scăzută. Cu toate acestea, în familiile rămase cu un copil cu sindrom Down, sindromul apare mult mai frecvent pe parcursul mai multor generații - este un sindrom familial.

Studiile citogenetice efectuate asupra părinților și a urmașilor acestora, în aceste cazuri rare , explică cauza sindromului Down familial. Analizele arată că unul dintre părinți are o translocație 14/21, D/G (Figura 8.18). Adică

www.medilibros.com

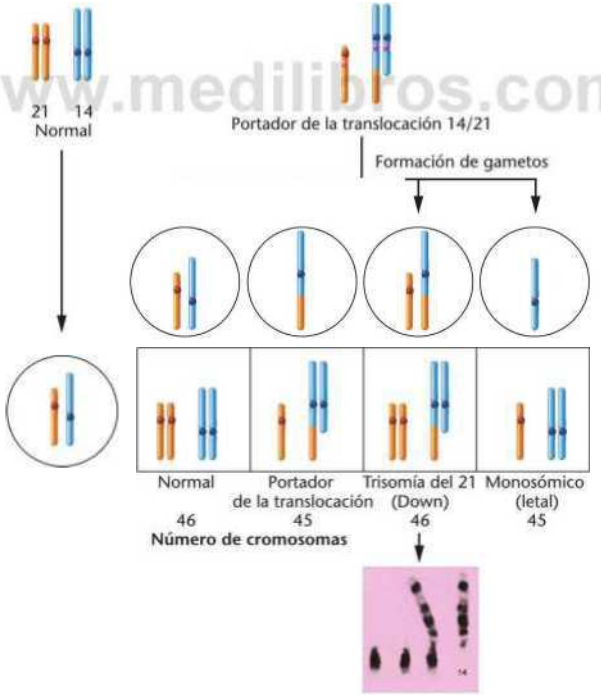


FIGURA 8.18 Cromosomas implicados en el síndrome de Down familiare influencia de la translocación. La fotografía ilustra los cromosomas relevantes de un descendiente con una trisomía del 21 producida por un padre portador de una translocación.

, unul dintre părinți are cea mai mare parte a cromozomului 21 din grupa G translocată la capătul cromozomului 14 din grupa D. Acest individ este fenotipic normal, chiar dacă are doar 45 de cromozomi și, prin urmare, este numit purtător echilibrat al translocației. În timpul meiozei, la acest individ, unul dintre gameți are două copii ale cromozomului 21: un cromozom normal și o a doua copie translocată pe cromozomul 14. Când acest gamet este fertilizat de un gamet haploid normal, zigotul rezultat va avea 46 de cromozomi, dar trei copii ale cromozomului 21. Acești indivizi prezintă - sindromul Down. Alți posibili urmași viabili au fie genomul diploid normal (fără translocație), fie translocația echilibrată, la fel ca părintele. Ambele cazuri au ca rezultat indivizi normali. În al patrulea caz, rezultatul este un individ monosomic, care este letal. Deși nu este ilustrat în figură, se consideră că are loc și segregarea adiacent-2, deși rar. Astfel de gameți nu sunt echilibrați, iar letalitatea apare după fertilizare.

Descoperirile anterioare au permis geneticienilor să rezolve paradoxul aparent al unui fenotip trisomic moștenit la un individ cu un număr de cromozomi aparent diploid. Interesant este că „purtătorul", care are 45 de cromozomi și prezintă un fenotip normal , nu are un complement diploid complet de material genetic . Translocația are ca rezultat pierderea unei mici porțiuni atât din cromozomul 14, cât și din cromozomul 21. Acest lucru se întâmplă deoarece capetele ambilor cromozomi au trebuit să se rupă înainte de a fuziona. Aceste regiuni specifice sunt cunoscute ca fiind două dintre numeroasele locații cromozomiale care adăpostesc copii multiple ale genelor care codifică ARNr, componenta principală a ribozomilor. În ciuda pierderii a până la 20% din aceste gene, individul purtător nu este afectat.

8.9

La oameni, zonele fragile sunt susceptibile la rupturi cromozomiale.

Încheiem acest capitol cu o scurtă prezentare a rezultatelor unei descoperiri interesante făcute în jurul anului 1970, în timpul observării cromozomilor în metafază într-o cultură de celule umane. În celulele anumitor indivizi, o regiune specifică a unuia dintre cromozomi nu s-a colorat, dând aspectul unei lacune. La alți indivizi ai căror cromozomi au prezentat această morfologie, lacunele au apărut în alte locații din cadrul complementului cromozomial. Aceste regiuni au devenit în cele din urmă cunoscute sub numele de zone fragile , deoarece păreau a fi susceptibile la ruperea - cromozomilor atunci când erau cultivate în absența anumitor substanțe chimice, cum ar fi acidul folic, care este prezent în mod normal în mediul de cultură .

Cauza fragilității acestor situsuri este necunoscută. Cu toate - acestea, deoarece reprezintă puncte de - a lungul cromozomului care sunt susceptibile la rupere, aceste situsuri pot indica regiuni în care cromatina nu este strâns înfășurată. Rețineți că , deși aproape toate studiile asupra situsurilor fragile au fost efectuate in *vitro* Folosind celule în diviziune mitotică, interesul pentru acestea a crescut atunci când s-a stabilit o asociere clară între mai multe dintre aceste situsuri și fenotipurile modificate corespunzătoare, inclusiv retardul mintal și cancerul.

Sindromul X fragil (sindromul Martin-Bell)

Deși majoritatea situsurilor fragile nu par a fi asociate cu sindroame clinice, persoanele care poartă un situs sensibil la folat pe cromozomul X (Figura 8.19) au sindromul X fragil (sau *sindromul Martin-Bell)* . cea mai frecventă formă de întârziere

FIGURA 8.19 Cromozomul X fragil uman. „Lacuna" (aproape de partea inferioară a cromozomului) este asociată cu sindromul X fragil, o

dizabilitate intelectuală ereditară. Acest sindrom afectează unul din 4.000 de bărbați și una din 8.000 de femei. Deoarece femeile afectate poartă de obicei un singur cromozom X fragil, această tulburare este considerată o trăsătură dominantă . Din fericire, penetranța nu este completă, iar trăsătura este exprimată pe deplin doar la aproximativ 30% dintre femei și 80% dintre bărbații cu un cromozom X fragil . Pe lângă dizabilitatea intelectuală, bărbații afectați au fețe lungi și înguste, cu bărbie proeminentă, urechi mari și testicule mărite.

O genă adesea găsită în zona fragilă este responsabilă pentru acest sindrom. Această genă, *FMR1,* este una dintre numeroasele gene descoperite în care o secvență de trei nucleotide se repetă de mai multe ori, mărind dimensiunea genei. Acest fenomen, numit repetiții trinucleotidice, a fost găsit și în alte afecțiuni umane, cum ar fi boala Huntington și distrofia miotonică. În *FMR1,* secvența - trinucleotidică CGG se repetă într-o zonă netradusă adiacentă secvenței codificatoare a genei (numită „regiunea din amonte"). Numărul de repetiții variază foarte mult în populația umană, iar un număr mare este corelat direct cu exprimarea sindromului X fragil. Persoanele normale au între 6 și 54 de repetiții, în timp ce cele cu 55 până la 230 de repetiții sunt considerate „purtători" ai afecțiunii . Un număr peste 230 de repetiții duce la exprimarea sindromului.

Se crede că atunci când numărul de repetiții atinge acest nivel, regiunile CGG ale genei sunt modificate chimic în așa fel încât bazele repetiției și bazele înconjurătoare sunt metilate, ceea ce duce la inactivarea genei. Produsul normal al genei este o proteină care leagă ARN-ul, FMRP, despre care se știe că este exprimată în creier. În prezent se acumulează dovezi care leagă direct absența acestei proteine din creier de deficitele cognitive asociate cu sindromul.

Din punct de vedere genetic, unul dintre cele mai interesante aspecte ale sindromului X fragil este instabilitatea repetițiilor CGG. Un individ cu 6 până la 54 de repetiții transmite o genă cu același număr de copii copiilor săi. Cu toate acestea, purtătorii cu 55 până la 230 de repetiții, deși nu prezintă riscul de a dezvolta ei înșiși sindromul, pot transmite o genă cu un număr crescut de repetiții - urmașilor lor . Numărul de repetiții continuă să crească în generațiile ulterioare, ilustrând fenomenul cunoscut sub numele de anticipație genetică. Odată ce pragul de 230 de repetiții este depășit , manifestarea afecțiunii devine mai severă în generațiile succesive, pe măsură ce numărul de repetiții de trinucleotide crește . Cel mai interesant este faptul că extinderea de la statutul de purtător (55 până la 230 de repetiții) la statutul de sindrom (mai mult de 230 de repetiții) are loc numai prin moștenire maternă , dar nu și prin moștenire paternă . Prin urmare , un „purtător" de sex masculin poate transmite un cromozom stabil fiicei sale, care poate apoi transmite un cromozom instabil cu un număr mai mare de repetiții urmașilor săi. Bunicul ei a fost sursa cromozomului original .

Relația dintre zonele fragile și cancer

Deși studiul sindromului X fragil a fost primul care a atras atenția geneticienilor asupra regiunilor cromozomiale instabile, în 1996, Carlo Croce, Kay Huebner și colegii lor au detectat o legătură între un situs fragil autosomal și cancerul pulmonar . Ulterior, au postulat că defectul era asociat cu formarea diferitelor tipuri de tumori. Croce și Huebner au demonstrat pentru prima dată că gena *FHIT* Triada fragilă a histidinei (FHIT), situată în situsul fragil bine definit *FRA3B* (pe brațul p al cromozomului 3), este adesea alterată sau absentă în celulele prelevate din tumorile persoanelor cu cancer pulmonar . Studii mai ample au arătat acum că produsul proteic normal al acestei gene este absent în celulele multor alte tipuri de cancer, inclusiv cele ale esofagului, sânului, colului uterin, ficatului , rinichilor , pancreasului, colonului și stomacului. Genele precum FHIT , care sunt situate în regiuni fragile , prezintă , fără îndoială, o susceptibilitate mai mare la mutații și deleții.

Mai recent, Muller Fabbri și Kay Huebner, lucrând cu alți colegi din laboratorul lui Croce, au identificat și studiat un alt situs fragil, cu niște rezultate extrem de interesante . Gena WIVOX este situată la situsul FRA16D *de* pe cromozomul 16. La fel ca gena FHIT , A fost asociată cu diverse tipuri de cancer uman. În special , sub formă de *FHIT,* s-a constatat că fie lipsește , fie este redusă la tăcere genetic în marea majoritate a tumorilor pulmonare , precum și în țesutul canceros al sânului , ovarelor , prostatei, vezicii urinare , esofagului și pancreasului . Atunci când gena este prezentă, dar redusă la tăcere, se consideră că ADN-ul său este puternic metilat , ceea ce o face inactivă. În plus, se crede că gena activă acționează și ca un *supresor tumoral ,* îndeplinind o funcție de supraveghere prin recunoașterea celulelor canceroase și inducerea apoptozei, eliminându-le eficient înainte ca tumorile maligne să se poată forma .

DE GENOMICĂ

Atlas de Genetică și Citogenetică în Oncologie și Hematologie

MG Área de estudio. Exploración de la Genómica

ŞI În acest capitol, am discutat despre modul în care variațiile numărului de cromozomi și modificările structurii cromozomiale pot afecta conținutul cromozomial al gameților, ducând la modificări genetice la urmași și la apariția unor fenotipuri anormale. *Atlasul de Genetică și Citogenetică în Oncologie și Hematologie* este o revistă online realizată de geneticieni experți , precum și o bază de date citogenetică specializată în catalogarea anomaliilor cromozomiale și a genelor implicate în diferite tipuri de cancer. Hematologia este studiul sângelui . O mare parte din informațiile prezentate în atlas provin din studii clinice efectuate pe pacienți cu cancere de sânge, cum ar fi diferitele tipuri de leucemie (cancerul leucocitelor), care au relevat variații ale numărului de cromozomi și defecte ale structurii cromozomiale (duplicații, deleții și translocații). În acest exercițiu, vom explora site-ul web al atlasului pentru a afla mai multe despre tulburările cromozomiale la om.

■ Exercițiul I. Explorarea cromozomului 9

1. Accesați Atlasul *de Genetică și Citogenetică în Oncologie și Hematologie* la http://atlasgeneticson-cology.org .
2. Rețineți că pagina principală listează intrările din baza de date în diverse moduri, inclusiv o listă alfabetică a genelor legate de cancer , o listă pe cromozomi și un catalog și rapoarte despre cazuri. Vom explora fiecare dintre aceste secțiuni.
3. În secțiunea *Entități după cromozom* , faceți clic pe cromozomul 9. Explorați numeroasele linkuri către anomalii ale cromozomului 9 implicate în diferite leucemii. Rețineți că multe dintre acestea sunt translocații. De exemplu, c9;12(q34;p13) reprezintă o translocație între banda 34 a brațului q al cromozomului 9 și banda 13 a brațului p al cromozomului 12.
4. Găsiți linkul către *Melanoma familială* , examinați informațiile legate de această tulburare și apoi răspundeți la următoarele întrebări:

   a) Descrieți această boală.

   b) Ce locus de pe cromozomul 9 este implicat în această boală? Ce genă este localizată la acest locus? Care este funcția acestei gene? (Utilizați linkurile de pe pagina dedicată melanomului familial sau explorați secțiunea *Gene)* (Din această bază de date pentru a afla mai multe despre funcția genei .)

■ Exercițiul II. Studii de caz: exemple rare de anomalii cromozomiale

Secțiunea *Rapoarte de caz* Atlasul *(consultați* linkul de pe pagina principală) oferă acces la rapoarte despre exemple de afecțiuni rare cauzate de anomalii cromozomiale observate la diferiți pacienți. Multe dintre aceste rapoarte conțin exemple excelente de date generate - folosind tehnicile citogenetice explicate în acest capitol și în alte părți ale cărții.

1. Găsiți linkul către raportul pregătit de Shambhu Roy, Sonal Bakshi, Shailesh Patel și alți colegi . Explorați informațiile prezentate în raportul lor și apoi răspundeți la următoarele întrebări:

   a. Ce anomalie cromozomială raportează acest grup ?

   b. Ce tehnici au folosit pentru a diagnostica această afecțiune și ce probe de țesut au fost utilizate în diagnostic ?

   c. Ce tulburare este asociată cu acest pacient?

   d. De ce este această afecțiune numită „ LMC tipică " (LMC, leucemie mieloidă cronică)? (Consultați capitolul 9 și figura 19.4 pentru răspunsul la această întrebare .)

   e. Menționați o altă afecțiune genetică asociată cu prezența unor copii suplimentare ale cromozomului 21.

2. Explorați mai multe studii de caz prezentate în atlas pentru a afla despre alte exemple rare de anomalii cromozomiale observate de oamenii de știință și medicii din întreaga lume.

STUDIU DE CAZ | Povești cu pești

ŞI Creșterea excesivă a vegetației acvatice, controlată în mod normal prin dragare sau erbicide, reprezintă o problemă semnificativă pentru întreținerea căilor navigabile private și publice. În 1963, crapi chinezești diploizi au fost introduși în Arkansas pentru a se hrăni cu vegetație acvatică, dar acești crapi s-au reprodus prodigios și s-au răspândit extraordinar, devenind un pericol pentru ecosistemele acvatice din 35 de state.

În anii 1980 , multe state americane au adoptat crapul chinezesc triploid ca alternativă , datorită sterilității sale ridicate (deși nu absolute) și duratei lungi de viață de șapte până la zece ani . Astăzi , majoritatea statelor americane solicită un permis pentru controlul vegetației folosind crapi triploizi , stipulând ca aceștia să fie ținuți în corpul de apă în care sunt introduși. Modificările genetice ale organismelor pentru a obține rezultate specifice vor deveni cu siguranță mai frecvente în viitor și vor ridica câteva întrebări interesante .

1. Luând ca exemplu crapul triploid, ce controverse ar putea apărea pe măsură ce punem la dispoziție alte specii modificate similar pentru utilizare pe scară largă în rezolvarea unor probleme specifice ?
2. Dacă ați fi un funcționar responsabil cu o anumită sursă de apă , ce întrebări ați pune înainte de a aproba introducerea unei specii poliploide produse în laborator în acele surse de apă ?
3. De ce ar fi mai puțin dezirabilă crearea și utilizarea unei specii de crap tetraploid în situația de mai sus ?

Puntos de resumen

1. Modificările conținutului diploid al cromozomilor se numesc aberații cromozomiale sau mutații cromozomiale .
2. Studiile tulburărilor monosomice și trisomice ne permit să înțelegem mai bine echilibrul genetic delicat , esențial pentru dezvoltarea normală a organismelor .
3. Când sunt prezente mai mult de două seturi haploide de cromozomi , acestea pot fi derivate din aceeași specie sau din specii diferite , formând baza autopoliploidiei , respectiv alotetraploidiei .
4. Ștergerile sau duplicările segmentelor unei gene sau cromozomului pot fi sursa unor fenotipuri mutante, cum ar fi sindromul Cri du cat la oameni și ochii Bar la *Drosophila,* în timp ce duplicările pot fi deosebit de importante ca sursă de gene noi sau amplificate .
5. Inversiile și translocațiile pot inițial să nu provoace nicio pierdere de informație genetică sau doar o pierdere mică și pot să nu aibă inițial efecte dăunătoare. Cu toate acestea, combinațiile heterozigote ale segmentelor cromozomiale implicate pot duce la gameți genetic anormali după meioză , ducând adesea la letalitate sau inviabilitate.
6. Locurile fragile de pe cromozomii mitotici umani au atras interesul cercetătorilor , deoarece un astfel de loc de pe cromozomul X este asociat cu cea mai comună formă de retard mintal ereditar, în timp ce alte locuri autozomale au fost legate de diverse forme de cancer .

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

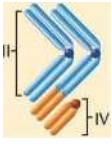
IDEI ȘI SOLUȚII

1. Într-o încrucișare cu porumb, în care au fost implicate trei gene, *a, bye,* un individ heterozigot *(abe/* Încrucișarea (abc) a fost încrucișată cu o *genă (abe/abe).* Deși cele trei gene au fost separate de-a lungul cromozomului, sugerând posibilitatea observării gameților recombinanți și a fenotipurilor rezultate, au fost recuperate doar două fenotipuri: *abc* și + 4-+. În plus, încrucișarea a dus la semnificativ mai puține plante decât se aștepta . Ați putea explica de ce alte fenotipuri nu au fost recuperate și de ce viabilitatea a fost redusă ?

   Soluție. Unul dintre cei doi cromozomi are o inversiune care se suprapune cu toate cele trei gene, împiedicând efectiv recuperarea urmașilor „recombinați". Dacă este o inversiune paracentrică și genele sunt clar separate (asigurându-se că va avea loc un număr semnificativ de încrucișări între ele), atunci se vor forma numeroși cromozomi acentrici și dicentrici, ducând la reducerea observată a viabilității.
2. S-a constatat că o *specie masculă de Drosophila* dintr -o tulpină sălbatică avea doar șapte cromozomi, în timp ce în mod normal *2n* = 8. O examinare detaliată a relevat că un membru al cromozomului IV (cel mai mic cromozom) era atașat (translocat) la capătul distal al cromozomului II și își pierduse centromerul, explicând astfel reducerea numărului de cromozomi.

   (a) Desenați o diagramă a tuturor membrilor cromozomilor II și IV aflați în sinapsă în timpul meiozei I.

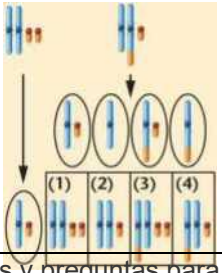
   Soluție



   (b) Dacă acest mascul este încrucișat cu o femelă cu un complement cromozomial normal , este homozigot pentru mutația recesivă fără ochi *(ey).* În ceea ce privește cromozomul IV, ce combinații cromozomiale vor apărea la urmași în raport cu cromozomii II și IV?

Solución

Hembra Macho con normal translocación



(c) Referindu-ne la diagrama soluției din partea (b), ce raporturi fenotipice vor apărea în funcție de prezența ochilor, presupunând că toate - combinațiile de cromozomi supraviețuiesc?

Soluţie

(1) normal (heterozigot).
(2) fără ochi (monosomic, cu cromozomul IV de la mamă).
(3) normal (heterozigot; trisomic și poate muri).
(4) normal (heterozigot, translocație echilibrată).

Raportul final este 3/4 normal: 1/4 fără ochi.

Problemas y preguntas para la discusión

1 CUM ȘTIM",

1. En este capitulo nos hemos centrado en las mutaciones cromosómicas resultantes de un cambio en el número o en la disposición de los cromosomas. A lo largo de nuestras explicaciones 6. nos hemos encontrado con numerosas oportunidades para considerar los métodos y razonamientos que permitieron admitir buena parte de esta información. A partir de las explicaciones 7. dadas en el capítulo, ¿qué respuestas propondrían para las siguientes cuestiones fundamentales? 8.

(a) ¿Cómo sabemos que el cromosoma adicional que provoca 9. el síndrome de Down suele tener un origen materno?
(b) ¿Cómo sabemos que se produce aneuploidía en cada uno de los 22 autosomas de la especie humana durante la concepción, 10. aun cuando los seres humanos aneuploides no sobreviven al desarrollo embriónico o fetal y no pueden, por tanto, ser observados en el nacimiento? 11.
(c) ¿Cómo sabemos que determinados fenotipos mutantes específicos se deben a variaciones en el número o estructura de los cromosomas?
(d) ¿Cómo sabemos que el fenotipo mutante del ojo Bar en *Drosophila* es debido a una región duplicada de un gen, en lugar de a un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen?

2. Pentru o specie cu un număr diploid de 18, indicați câți cromozomi vor fi în nucleii somatici ai indivizilor haploizi , triploizi, tetraploizi, trisomici și monosomici.
3. Definiți și distingeți următoarele perechi de termeni:

aneuploidie/euploidie monosomie/trisomie sindrom Patau/sindrom Edwards autopoliploid/alopoliploid autotetraploid/amfidiploid inversiune paracentrică/inversiune pericentrică

4. Comparați timpii relativi de supraviețuire ai persoanelor cu sindrom Down, sindrom Patau și sindrom Edwards . Speculați de ce există astfel de diferențe.

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com

Ce dovezi sugerează că sindromul Down este mai des rezultatul non - disjuncției în timpul ovogenezei decât în timpul spermatogenezei ?
Ce dovezi există că cariotipurile aneuploide se produc în timpul concepției la specia umană , dar că în mod normal sunt neviabile?
Comparați fertilitatea unui alotetraploid cu cea a unui autotriploid și a unui autotetraploid.
Descrieți originea bumbacului cultivat în America.
Preziceți cum ar putea apărea configurațiile sinaptice ale perechilor de cromozomi omologi atunci când un membru este normal , iar celălalt prezintă o deleție sau o duplicație.
Se spune că investițiile sunt „supresoare de crossover " . Este această terminologie corectă din punct de vedere tehnic? Dacă nu , reformulează descrierea cu acuratețe.
Comparați structura genetică a gameților derivați din tetradele indivizilor heterozigoți pentru o inversiune atunci când crossing -ul are loc în cadrul unei inversiuni paracentrice și în cadrul unei inversiuni pericentrice .
12. Hemoglobina umană adultă este un tetramer care conține două lanțuri polipeptidice alfa (α) și două lanțuri beta (***β***) . Gena duster pe cromozomul 16 și grupul de gene *fi* Pe cromozomul 11, două polipeptide au similarități în ceea ce privește aminoacizii, astfel încât 61 dintre aminoacizii din polipeptida α-globină (care are o lungime de 141 de aminoacizi) sunt partajați într- o secvență identică cu polipeptida β-globină (care are o lungime de 146 de aminoacizi). Cum ar putea fi explicată existența a două polipeptide cu o funcție și o structură parțial comune, dar situate pe doi cromozomi diferiți?
13. privind rolul duplicării genelor în procesul evolutiv și dovezile care susțin această ipoteză.
14. Ce roluri au jucat investițiile și translocațiile în procesul evolutiv?
15. Primăvara. *Primula kewensis,* Are 36 de cromozomi care sunt similari ca aspect cu cromozomii a două specii înrudite, Primula *floribunda (2n* = 18) și *Primula*

verticillata (2n = 18). Cum ar fi putut *P. kewensis* să apară din aceste specii? Cum ați numi P. *kewensis* în termeni genetici?

16. Se știe că diferite varietăți de crizanteme au 18, 36, 54, 72 și 90 de cromozomi; toți sunt multipli ai unui set de bază de 9 cromozomi. Cum ați descrie aceste varietăți din punct de vedere genetic? Ce trăsătură au în comun cariotipurile acestor varietăți? A fost descoperită o varietate cu 27 de cromozomi , dar era sterilă. De ce?
17. *Drosophila* poate fi monosomică pentru cromozomul 4 și totuși fertilă. Comparați rezultatele Ft și F2 dintre următoarele încrucișări , în care este implicat caracterul recesiv al genelor pliate ale cromozomului 4 : (a) monosomic IV, gene pliate X diploid , gene normale; (b) monosomic IV, gene normale X diploid, gene pliate.
18. În încrucișările dintre autotetraploide, rapoartele mendeliene sunt modificate. Să presupunem că o plantă exprimă trăsătura dominantă verde (semințe) și este homozigotă (WWlY). Aceasta este încrucișată cu o alta cu semințe albe, care este , de asemenea, homozigotă (VVM'H'H1) . Dacă o singură alelă dominantă este suficientă pentru a produce semințe verzi, preziceți rezultatele F1 și F2 . a unei astfel de încrucișări . Presupunem că sinapsisul dintre perechile de cromozomi are loc aleatoriu în meioză.
19. După ce ați stabilit corect raportul din F2 în problema 18 , preziceți raportul din F2. a unei încrucișări „dihibride " pentru două trăsături care se transmit independent (de exemplu, Pt = WWWWAAAA X *wwwwaaaa).*
20. Mutațiile numite *bobbed* La *Drosophila, mușteledetip* sălbatic rezultă dintr -o serie de reduceri variabile (deleții) ale numărului de gene amplificate care codifică ARNr. Cercetătorii care încearcă să mențină un stoc fluctuant au documentat în mod repetat tendința lor de a reveni la tipul sălbatic în generații succesive . Propuneți un mecanism bazat pe recombinarea meiotică care ar putea explica acest fenomen de reversie . De ce devin mușteledetip sălbatic *mai* răspândite în tulpinile cultivate de Drosophila ?
21. Rezultatul unei singure încrucișări între cromatide non-surori în bucla de inversie a unui individ heterozigot pentru inversie variază în funcție de natura inversiunii , paracentrice sau pericentrice . Ce diferențe pot fi așteptate?
22. Un cuplu, care își planifica viitorul familiei , știa că în ultimele trei generații , din partea masculină, a existat un număr substanțial de nașteri de copii morți și mai mulți sugari născuți cu malformații care au murit la o vârstă fragedă. Soția studiase genetica și i-a recomandat soțului ei să meargă la o clinică de consiliere genetică, unde i s-a efectuat o analiză completă a cariotipului . Deși s-a constatat că acesta avea un număr normal de 46 de cromozomi, analiza benzilor a relevat că unul dintre membrii perechii de cromozomi 1 (grupa A) avea o inversiune care acoperea 70% din lungimea sa. Cromozomul omolog și restul au prezentat secvența normală de benzi.
    (a) Cum ar putea fi explicată incidența ridicată a nașterilor de copii morți din trecut?
    (b) Ce poți prezice despre probabilitatea ca viitorii copii să fie normali sau anormali?
    (c) Ai sfătui o femeie să „aștepte" până la sfârșitul fiecărei sarcini pentru a determina dacă fătul a fost normal? Și dacă nu, ce i-ai sugera să facă?

Probleme suplimentare picante

23. *de Drosophila*, heterozigotă pentru genele autozomale legate *de a, b, c, d* și *e (abcde/+ +),* a fost retroîncrucișată +++) , cu un mascul homozigot pentru alelele recesive . Chiar dacă distanța dintre aceste loci era de cel puțin trei unități geografice , au fost identificate doar patru fenotipuri, ceea ce a dus la următoarele rezultate .

Fenotip	Numărul de muște
+ + + + +	440
respecta	460
+ + + + e	48 de ani
abcd +	52
	Total = 1.000

De ce nu apar celelalte fenotipuri recombinante așteptate ? Pot fi aceste loci cartografiate din datele de mai sus? Dacă da, determinați distanțele lor pe hartă.

24. O femeie care solicita consiliere genetică a fost identificată ca fiind heterozigotă pentru o rearanjare cromozomială între al doilea și al treilea cromozom. Cromozomii ei sunt prezentați mai jos, comparativ cu cei ai unui cariotip normal:

(a) Ce tip de aberație cromozomială se manifestă?
(b) Folosind hârtie și creion, demonstrați cum se împerechează acești cromozomi în timpul meiozei . Asigurați-vă că etichetați diferitele segmente de cromozomi.
(c) Această femeie era fenotipic normală. Vă surprinde asta ? De ce sau de ce nu ? În ce circumstanțe s-ar putea aștepta un astfel de efect fenotipic de la o astfel de rearanjare?

25. Femeia din problema 24 a avut două avorturi spontane. Vine să vă consulte în calitate de consilier genetic profesionist , ridicând următoarele întrebări : Există o explicație genetică pentru avorturile ei spontane frecvente? Ar trebui să renunțe la încercările de a avea propriul copil? Dacă nu, care este probabilitatea să aibă un copil sănătos ? Oferiți un răspuns argumentat la fiecare dintre preocupările ei .

26. Într -un studiu citogenetic recent efectuat pe 1021 de cazuri de sindrom Down , s-a constatat că 46 sunt rezultatul unor translocații , cea mai frecventă fiind simbolizată prin t(14^1). Ce reprezintă acest simbol și câți cromozomi ne-am aștepta să fie prezenți la persoanele afectate de sindromul Down t (14;21)?

27 O femeie cu fenotipic normal și un bărbat cu displazie ectodermică anhidrotică, o boală a pielii legată de cromozomul X , au un fiu cu sindrom Klinefelter (47,XXY). Mama are pielea complet normală . În schimb, fiul ei are zone de piele normală și zone de piele anormală.

(a) Care părinte a contribuit la gametul anormal ?

(b) Folosind terminologia genetică adecvată , descrieți eroarea meiotică care a apărut. Asigurați-vă că indicați în ce diviziune a apărut eroarea .

(c) Folosind terminologia genetică adecvată, explicați fenotipul pielii copilului .

28. Pentru a investiga originea non - disjuncției , au fost examinate 200 de ovocite umane care nu fuseseră fertilizate printr- o procedură de fertilizare *in vitro* (Angel, R. 1997. Am. J. Hum. Genet . 61:23-32) . Aceste ovocite își terminaseră meioza I și erau oprite în metafaza II (M1I). Majoritatea (67%) aveau un complement M1I normal în metafază , cu 23 de cromozomi, fiecare cu două cromatide surori unite printr-un centromer comun. Toate ovocitele rămase aveau o compoziție cromozomială anormală . În mod surprinzător , având în vedere trisomia, niciunul dintre ovocitele anormale nu avea 24 de cromozomi .

(a) Interpretați aceste rezultate în raport cu originea trisomiilor, indicând relația lor cu non-disjuncțiile și când se întâmplă acest lucru . De ce sunt aceste rezultate surprinzătoare?

(b) Un număr mare de ovocite anormale conțineau 22 1/2 cromozomi; adică 22 de cromozomi plus o singură cromatidă reprezentând cromozomul 1/2 . Dacă astfel de ovocite continuă meioza și sunt fertilizate de spermatozoizi normali, ce compoziții cromozomiale vor avea zigoții?

(c) Cum a putut apărea complementul de 22 1/2 cromozomi ? Răspundeți la această întrebare cu un desen care include mai multe perechi de cromozomi.

(d) Aceste fapte susțin sau infirmă teoria general acceptată privind non-disjuncția și trisomia, așa cum este descrisă în Figura 8.1?

29 Într -un studiu genetic, a fost investigată o familie cu cinci copii fenotipic normali . Doi erau homozigoți pentru o translocație robertsoniană între cromozomii 19 și 20. (Aveau două copii identice ale cromozomului fuzionat.) Acești copii aveau doar 44 de cromozomi, dar un corp genetic complet . Trei dintre copii erau heterozigoți pentru translocație și aveau 45 de cromozomi, cu un cromozom translocat plus o copie normală a cromozomilor 19 și 20. Alte două sarcini au dus la nașteri de copii morți. S-a constatat că părinții erau veri primari . Pe baza informațiilor de mai sus, determinați structura cromozomială a părinților. Ce a cauzat nașterile de copii morți ? De ce a fost descoperirea că părinții erau veri primari o informație importantă pentru înțelegerea geneticii acestei familii?

30. O fetiță în vârstă de 3 ani a prezentat câteva semne precoce ale - sindromului Turner , care rezultă dintr-o compoziție cromozomială 45, X . Analiza cariotipică a evidențiat două tipuri de celule : 46,XX (normal) și 45,X. Propuneți un mecanism pentru originea acestui mozaicism.

31. O femeie normală a fost descoperită cu 45 de cromozomi, dintre care unul avea o translocație robertsoniană conținând o mare parte din cromozomii 18 și 21. Discutați posibilele rezultate ale urmașilor ei dacă soțul ei are un cariotip normal.

32. Sindroamele Prader-Willi și Angclman (vezi *Capitolul* 4) sunt afecțiuni care apar la oameni și sunt parțial rezultatul amprentării genetice, în care o genă specifică este „etichetată" în timpul formării gameților la părintele de origine. În aceste două sindroame , o porțiune a brațului lung al cromozomului 15 (15q1 până la 15q13) este amprentată . O altă afecțiune, sindromul Beckwith-Wiedemann (creștere accelerată și risc crescut de cancer), este asociată cu anomalii ale genelor amprentate pe brațul scurt al cromozomului 11. Toate cele trei sindroame menționate mai sus apar atunci când secvențele amprentate sunt expuse anormal de un eveniment genetic sau cromozomial. Un astfel de eveniment este disomia uniparentală (UPD), în care un individ primește doi omologi ai unui cromozom (sau ai unei părți a unui cromozom) de la un părinte și niciun omologi de la celălalt . În multe cazuri, UPD nu are consecințe; cu toate acestea, dacă este implicat cromozomul 11 sau 15 , acest lucru, combinat cu amprentarea genomică, poate duce la complicații. Următoarele sunt posibilele origini ale UPD. Furnizați o diagramă și o explicație pentru fiecare dintre aceste alternative.

1. *Salvare trisomică:* pierderea unui cromozom la un zigot trisomic .
2. *Salvare monosomă:* câștigarea unui cromozom într-un zigot monosomic .
3. *Complementație gametică:* fertilizarea unui gamet cu două copii ale unui cromozom de către un gamet fără copii ale acelui cromozom.
4. *Formarea unui izocromosom:* un cromozom care conține două copii ale unui braț (de exemplu, 15q-15q) în loc de unul singur.

La distribución de las múltiples pequeñas moléculas de ADN mitocondrial (puntos brillantes de color amarillo-naranja) y del genoma nuclear (rojo) en una célula de *Euglena gracilis*.

9

Moștenire extranucleară

CONCEPTE CAPITOL

►► **Spunem că moștenirea extranucleară are loc atunci când fenotipurile sunt rezultatul unor influențe genetice, altele decât transmiterea biparentală a genelor situate pe cromozomii adăpostiți în nucleu .**

►► **Moștenirea organitelor , un exemplu de moștenire extranucleară, se datorează transmiterii informației genetice conținute în mitocondrii sau cloroplaste, o moștenire care se primește de obicei de la un singur părinte.**

►* Trăsăturile determinate de ADN-ul mitocondrial sunt foarte adesea transmise prin intermediul gametului matern , în timp ce trăsăturile determinate de ADN-ul cloroplastului pot fi transmise uniparental sau biparental.

Efectul matern , care este exprimarea genotipului nuclear matern în timpul gametogenezei și în timpul dezvoltării timpurii, poate avea o mare influență asupra fenotipului unui organism .

LA De-a lungul istoriei geneticii , publicații ocazionale au contestat principiile de bază ale moștenirii mendeliene - aceea că fenotipul este transmis de gene nucleare situate pe cromozomii ambilor părinți. Anumite observații au relevat modele de moștenire care nu reflectă principiile mendeliene, iar unele indică o influență extranucleară aparentă asupra fenotipului. Înainte de stabilirea - rolului ADN-ului în genetică, astfel de observații erau în general privite cu scepticism . Cu toate acestea, odată cu creșterea cunoștințelor despre genetica moleculară și descoperirea ADN-ului în mitocondrii și cloroplaste, moștenirea extranucleară este acum recunoscută ca un aspect important al geneticii.

Există mai multe tipuri de moștenire extranucleară. Un tip important , la care ne-am referit mai sus, este descris și sub numele de moștenire la nivel de organite. În acest tip de moștenire , ADN-ul găsit în mitocondrii sau cloroplaste determină anumite caracteristici fenotipice ale urmașilor. Aceste cazuri sunt adesea recunoscute pe baza transmiterii uniparentale a acestor organite de la femelă, prin ovul, la urmași. Un al doilea tip, numit moștenire infecțioasă, rezultă din simbioză sau asocierea parazitară cu un microorganism. În astfel de cazuri, fenotipul moștenit este afectat de prezența microorganismelor în citoplasma celulelor gazdă. Al treilea tip se referă la efectul matern asupra fenotipului, prin produsele genelor nucleare stocate în ovul și transmise ulterior prin ovul la urmași . Aceste produse genetice sunt distribuite în celulele embrionilor în curs de dezvoltare și influențează fenotipul acestora.

Elementul comun în toate aceste cazuri este transmiterea informației genetice către urmași prin citoplasmă, mai degrabă decât prin nucleu. Această informație genetică provine foarte adesea doar de la unul dintre părinți. Aceasta va constitui definiția noastră a moștenirii extranucleare.

stilou

Moștenirea organitelor implică ADN-ul cloroplastelor și mitocondriilor.

În această secțiune și în următoarea, vom examina exemple de modele de moștenire legate de funcția cloroplastelor și mitocondriilor. Aceste modele sunt acum denumite, în mod potrivit, moștenire la nivel de organite . Cu toate acestea , înainte de descoperirea ADN-ului în aceste organite, mecanismul exact de transmitere a acestor trăsături, pe care le vom discuta mai jos, era neclar, cu excepția faptului că moștenirea lor părea a fi legată de ceva din citoplasmă, mai degrabă decât de genele nucleare. Foarte des (dar nu întotdeauna), trăsăturile păreau a fi transmise de la mamă prin ooplasmă, rezultând în rezultate variate din încrucișările reciproce .

Analizarea modelelor de moștenire rezultate din alelele mutante din cloroplaste și mitocondrii a fost dificilă din două motive. În primul rând, funcția acestor organite depinde de produsele genetice atât din ADN-ul nuclear , cât și din cel al organitelor , ceea ce face dificilă determinarea originii genetice a mutațiilor care afectează funcția organitelor . În al doilea rând , fiecare celulă descendentă primește un număr mare de astfel de organite după diviziunea celulară. În astfel de cazuri, dacă doar una sau câteva dintre aceste organite dobândesc o nouă mutație sau conțin una existentă într-o celulă cu o populație compusă în mare parte din organite normale , fenotipul mutant corespunzător poate să nu fie dezvăluit , deoarece organitele cărora le lipsește mutația vor îndeplini funcția de tip sălbatic corespunzătoare pentru celulă. O astfel de variație a conținutului genetic al organitelor se numește heteroplasmie. Prin urmare , analiza este mult mai complexă pentru trăsăturile controlate de genele codificate de ADN-ul organitelor decât pentru trăsăturile mendeliene controlate de genele nucleare .

Vom începe discuția noastră cu câteva exemple clasice care au atras atenția asupra moștenirii organitelor . Apoi, în secțiunile următoare, vom discuta informații legate de ADN și funcția genetică rezultată în fiecare organită.

Cloroplaste: variegație în floarea de la ora patru

În 1908, Carl Correns (unul dintre redescoperitorii lucrării lui - Mendel) a oferit primul exemplu de moștenire înrudită prin transmiterea cloroplastelor. Correns a descoperit o varietate a florii de ora patru, *Mirabilis ja lapa.* în care unele ramuri aveau frunze albe , altele aveau frunze verzi și altele aveau frunze pestrițe. Frunzele complet albe și zonele albe ale frunzelor pestrițe erau lipsite de clorofilă , care este în mod normal responsabilă de furnizarea culorii verzi. Clorofila este pigmentul care absoarbe lumina produs în cloroplaste.

Correns a devenit curios despre modul în care se moștenea această trăsătură fenotipică. După cum se arată în Figura 9.1, moștenirea, în toate combinațiile posibile de încrucișări, este strict determinată de fenotipul părții care furnizează ovulul . De exemplu , dacă semințele (reprezentând urmașii) provin din ovule situate pe ramuri cu frunze verzi , toate plantele fiice vor avea doar frunze verzi, indiferent de fenotipul părții care furnizează polenul. Correns a concluzionat

Originea polenului	Locația ovulului		
	Ramură albă	Ramură verde	Ramură pestriță
Ramură albă	Alb	Verde	Alb, verde sau pestriț
Ramură verde	Alb	Verde	Alb, verde sau pestriț
Ramură pestriță	Alb	Verde	Alb, verde sau pestriț

FIGURA 9.1 Descendent din încrucișarea dintre florile diferitelor ramuri ale plantelor pestrițe de tipul „ora patru". Fotografia prezintă pestrițarea frunzelor acelei plante.

Această moștenire a fost transmisă prin citoplasma plantei femele , deoarece polenul, care contribuie la zigotul cu puțină sau fără citoplasmă , nu a avut aparent nicio influență asupra fenotipului urmașilor .

Întrucât culoarea frunzelor este legată de cloroplaste, informația genetică responsabilă pentru acest model de moștenire a trebuit să fie conținută în aceste organite sau să fie prezentă într-un fel sau altul în citoplasmă și să exercite o influență asupra cloroplastului. Acum pare confirmat faptul că „defectul" genetic care elimină clorofila verde din petele albe de pe frunze este o consecință a unei mutații a ADN-ului conținut în cloroplast.

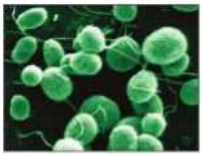
Cloroplaste»: mutații la *Chlamydomonas*

Alga unicelulară *Chlamydomonas reinhardtii* a oferit un sistem excelent pentru investigarea moștenirii plastidelor . Acest organism eucariot haploid (Figura 5.20) are un cloroplast mare care conține mai mult de 75 de copii ale unei molecule circulare de ADN bicatenar. Încrucișările care restabilesc diploidia sunt urmate imediat de meioză, iar diferitele etape ale ciclului de viață pot fi studiate cu ușurință în culturi de laborator . Prima mutație citoplasmatică , rezistența la streptomicină (strs) la Chlamydomonas , *a fost descoperită* de Ruth Sager în 1954. Deși cele două tipuri de împerechere ale Chlamydomonas , *mt~* și *mt~,* par să contribuie cu aceeași cantitate de citoplasmă la zigot, Sager a determinat că fenotipul str8 Este transmis doar de Părintele *Mt** (Figura 9.2). Încrucișările reciproce între tulpinile sensibile și cele rezistente produc rezultate diferite în funcție de genotipul *mt al părintelui* , care este exprimat la toți urmașii. După cum se arată în figură , jumătate dintre urmași sunt *mf.* și cealaltă jumătate a *acesteia,* indicând faptul că tipul de împerechere este controlat de o

genă nucleară care segregează într-o manieră mendeliană.

De la descoperirea lui Sager, au fost descoperite o serie de mutații la *Chlamydomonas* . (inclusiv rezistența sau dependența de o serie de antibiotice bacteriene) care prezintă un model similar de moștenire uniparentală . Toate aceste mutații au fost legate de transmiterea cloroplastelor , iar studiul lor ne-a extins cunoștințele despre moștenirea cloroplastelor.

După fertilizare , care implică fuziunea a două celule cu tipuri de împerechere opuse, cloroplastele celor două tipuri de împerechere fuzionează. După ce zigotul rezultat a suferit meioză și s-au produs celule haploide , se stabilește că informația genetică din cloroplastele celulelor fiice derivă numai de la părintele *mt** . Informația genetică prezentă în cloroplastul *mt*~ degenerează.



str mt* **x** *str mt*

1/2 *mf*	**1/2** *m*
toate *străzile**	

str ^{5} *m* x *str* m*

1/2 m	**1/2 m**
toate *strada* ^{5}	

FIGURA 9.2 Rezultatele încrucișărilor reciproce între tulpini rezistente la streptomicină *(strR* $^{)}$ *și* tulpini sensibile la streptomicină *(str5* $^{)}$ *ale* algei verzi *Chlamydomonas* (prezentate în fotografie).

La *Chlamydomonas, moștenirea* fenotipurilor afectate de mitocondrii este, de asemenea, uniparentală. Cu toate acestea, studiile de transmitere a mai multor cazuri de rezistență la antibiotice au arătat că părintele *mt~ este* cel care transmite informațiile genetice mitocondriale urmașilor . Acesta este exact opusul a ceea ce se întâmplă în cazul fenotipurilor derivate din cloroplaste, cum ar fi *str**. Semnificația moștenirii unei organite de la un părinte și a celeilalte organite de la celălalt părinte nu a fost încă determinată.

AHORA RESUELVA ESTO

9.1 *Chlamydomonas,* o algă verde eucariotă, poate fi sensibilă la antibioticul eritromicină, care inhibă sinteza proteinelor la procariote. La această algă, există două tipuri de împerechere, mitocondrială *(mt)* și *mt . Dacă o* celulă *mt sensibilă la antibiotice* se încrucișează cu o celulă *mt rezistentă* , toate celulele fiice sunt sensibile . Încrucișarea reciprocă *(mt rezistent* și *mt sensibil*) are ca rezultat rezistența tuturor celulelor fiice. Presupunând că mutația pentru rezistență se află în ADN-ul cloroplastului, ce se poate concluziona din rezultatele acestor încrucișări?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea transmiterii citoplasmatice a organitelor în algele unicelulare. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a rezultatelor așteptate a două posibilități: moștenirea uniparentală sau biparentală a trăsăturii.*

Mutații mitocondriale: primele studii asupra *Neurospora* și a drojdiei

Așa cum am menționat anterior, au fost descoperite și sunt studiate mutații care afectează funcția mitocondrială, dezvăluind că mitocondriile au și ele propriul sistem genetic . Mutațiile mitocondriale, precum cele ale cloroplastelor , sunt transmise prin citoplasmă în timpul reproducerii . În 1952, Mary B. Mitchell și Hershel K. Mitchell au studiat ciuperca pâinii *Neurospora crassa* . (Figura 9.3). Au descoperit o tulpină mutantă cu creștere lentă pe care au numit-o *poky* (leneș) — numit și *mi-1,* prin *moștenire maternă* (moștenire maternă) - Creșterea lentă este asociată cu o funcție mitocondrială afectată , cauzată în special de absența mai multor citocromi esențiali pentru transportul electronilor . În absența acestor citocromi, respirația aerobă , care duce la sinteza ATP, este redusă. Rezultatele încrucișărilor genetice între tulpinile de tip sălbatic și *cele mici* sugerează că trăsătura este moștenită matern . Dacă femela *este mică* , iar masculul de tip sălbatic, toate coloniile fiice vor fi *mici,* în timp ce încrucișarea reciprocă produce colonii normale , de tip sălbatic .

La drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Un alt studiu amplu al mutațiilor mitocondriale a fost realizat . Prima dintre aceste mutații, descrisă de Boris Ephrussi și colaboratorii săi în 1956 , a fost numită *petite* datorită dimensiunii mici a coloniilor *de* drojdie (Figura 9.4). De atunci, au fost descoperite și studiate numeroase mutații minore distincte , toate având o caracteristică comună : o deficiență în respirația celulară , din cauza transportului anormal de electroni *de* către mitocondrii . Acest organism este ***un*** anaerob *facultativ* . (un organism care poate funcționa atât în prezența , cât și în absența oxigenului), deci în absența oxigenului poate crește prin fermentarea glucozei prin

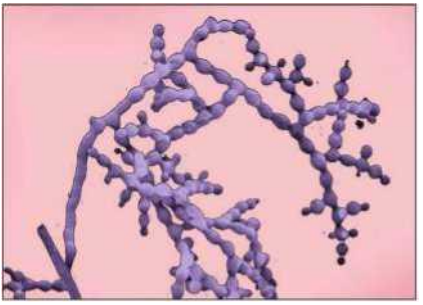
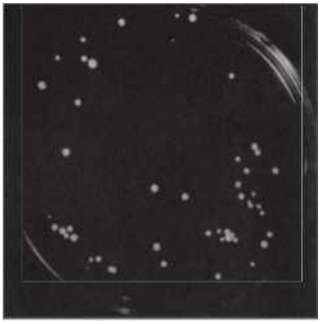


FIGURA 9.3 Micrografia que ilustra el crecimiento del hongo rosa del pan *Neurospora crassa.*

Colonii normale



Colonii *mici*

FIGURA 9.4 Comparație între coloniile normale și *cele mici* la drojdia *Saccharomyces cerevisiae*.

Glicoliză. Prin urmare, poate supraviețui pierderii funcției mitocondriale prin generarea de energie anaerob.

Figura 9.5 prezintă genetica complexă a *mutațiilor minore.* O mică parte a acestor mutanți rezultă din mutații nucleare în gene ale căror produse sunt transportate către și funcționează în mitocondrii. Acestea prezintă moștenire mendeliană și, prin urmare, sunt numite minore segregaționale . Mutanții rămași prezintă transmitere citoplasmatică, indicând modificări ale ADN-ului mitocondrial. Aceștia produc unul dintre cele două efecte posibile la încrucișări. Când *microorganismele neutre sunt încrucișate* În cazul tipului sălbatic, se generează produse meiotice (numite ascospori) care dau naștere doar coloniilor normale, de tip sălbatic. Același model continuă dacă acești urmași sunt retroîncrucișați cu *specii mici.* Neutri. Întrucât majoritatea „ neutrilor ” sunt complet lipsiți de ADNmt sau au pierdut o porțiune substanțială din acesta, pentru ca urmașii lor să fie normali, aceștia trebuie să moștenească și mitocondrii capabile de respirație aerobă de la părintele normal după reproducere . Acest lucru indică faptul că, la drojdie , mitocondriile sunt moștenite de la ambele celule-mamă. Mitocondriile funcționale de la părintele normal se replică în urmași și permit respirația aerobă .

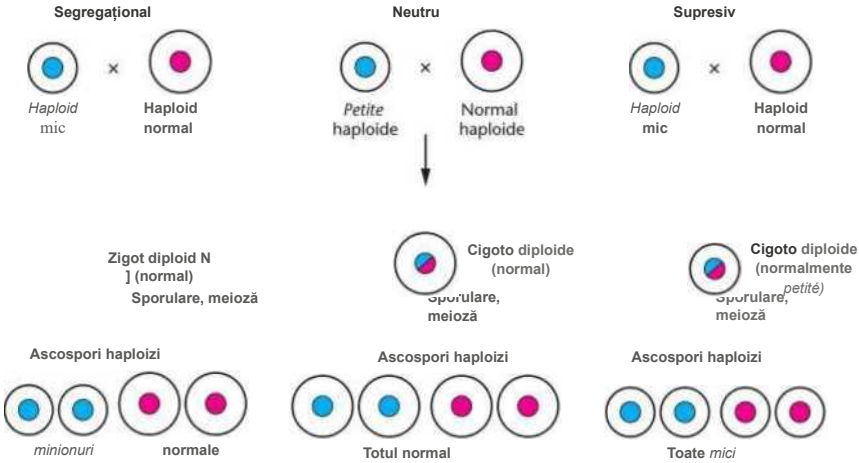


FIGURA 9.5 Rezultatul încrucișărilor dintre cele trei tipuri de mutații *minore* care afectează funcția mitocondrială la drojdia *Saccharomyces cerevisiae*.

Al treilea tip mutațional , *supresoarele mici,* Acest lucru duce la rezultate diferite. Încrucișările între mutanți și indivizi de tip sălbatic au ca rezultat zigoți diploizi care, după meioză, produc celule haploide , toate exprimând fenotipul mic . *Presupunând că* urmașii au primit mitocondrii de la ambii părinți, celulele *mici* se comportă ca ceea ce se numește o mutație dominant-negativă, care suprimă cumva funcția mitocondriilor de tip sălbatic .

Au fost propuse două ipoteze principale pentru a explica această supresie a ADN-ului organitelor. O explicație sugerează că ADN-ul mutant (sau șters) din mitocondrii (ADNmt) se replică mai rapid, permițând mitocondriilor mutante să „preia" sau să domine fenotipul pur și simplu datorită numărului lor. A doua explicație sugerează că recombinarea are loc între ADNmt mutant și ADNmt de tip sălbatic, introducând erori în ADNmt normal sau perturbându-i structura. Nu este clar care dintre aceste explicații este corectă, dacă este cazul .

ACUM REZOLVĂ ASTA

9.2 Un mutant mic este izolat într -o cultură de drojdie aerobă . Pentru a determina tipul de mutație responsabil pentru acest fenotip, s-a realizat o încrucișare între tulpina *mică* și o tulpină de tip sălbatic . Următoarele sunt trei rezultate posibile ale unei astfel de încrucișări.

(a) Toate de tip sălbatic .
(b) Unele *mici,* alte tipuri sălbatice .
(c) Toate *mici.*

Pentru fiecare set de rezultate, ce concluzii ar fi justificate cu privire la tipul de mutație *mică* ?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea faptului că fenotipul mic este legat de funcția mitocondrială și de modul în care mitocondriile sunt moștenite. Cheia rezolvării acesteia este să ne amintim că la drojdie, moștenirea mitocondrială este biparentală.*

9.2 Cunoașterea ADN-ului mitocondrial și cloroplastic ne ajută să explicăm moștenirea organitelor

Prima sugestie că atât mitocondriile, cât și cloroplastele au propriul ADN și un sistem de exprimare a informațiilor lor genetice a venit odată cu descoperirea mutațiilor și a modelelor de moștenire rezultate la plante, drojdii și alte ciuperci, așa cum tocmai am explicat. Întrucât atât mitocondriile, cât și cloroplastele sunt moștenite prin citoplasma maternă în multe organisme și întrucât fiecare dintre exemplele de mutații menționate mai sus ar putea fi teoretic legat de o funcție - alterată a cloroplastelor sau mitocondriilor, geneticienii au început să caute dovezi mai directe ale ADN-ului în aceste organite . Nu numai că s -a găsit ADN distinctiv ca o componentă normală atât a mitocondriilor , cât și a cloroplastelor , dar examinarea atentă a naturii acestei informații genetice ar oferi , de asemenea , indicii esențiale despre originea evolutivă a acestor organite .

ADN-ul organitelor și teoria endosimbiotică

Microscopiștii electronici nu numai că au documentat prezența ADN-ului în mitocondrii și cloroplaste, dar au observat și că această moleculă are o formă destul de diferită în aceste organite față de cea observată în nucleul celulelor eucariote care adăpostesc aceste organite (Figurile 9.6 și 9.7). ADN -ul cloroplastelor și mitocondriilor este remarcabil de similar cu cel găsit la bacterii . Această similaritate, împreună cu observația că exista un sistem genetic distinct , capabil de transcripție și traducere specifice organitelor, i-a determinat pe Linn Margulis și pe alții să postuleze așa - numita teorie endosimbiotică . În esență, teoria afirmă că mitocondriile și cloroplastele au apărut independent acum aproximativ 2 miliarde de ani din protobacterii libere (bacterii primitive). Progenitorii posedau capacitățile atribuite acum acestor organite - respirație aerobă și fotosinteză, respectiv. Această idee propune că aceste celule antice, asemănătoare bacteriilor, au fost înghițite de celule eucariote mai mari, primitive, care inițial nu aveau capacitatea de a respira aerob sau de a capta energia din lumina soarelui . Ulterior s-a dezvoltat o relație simbiotică benefică , în care bacteriile și - au pierdut în cele din urmă capacitatea de a funcționa autonom , în timp ce celulele gazdă eucariote au dobândit capacitatea de a efectua respirație oxidativă sau fotosinteză, după caz . Deși unele întrebări rămân fără răspuns , dovezile care susțin această teorie continuă să se acumuleze , iar principiile sale de bază sunt larg acceptate.

O scurtă examinare a mitocondriilor actuale ne va ajuta să înțelegem mai bine teoria endosimbiotică. În cursul evoluției care a urmat acelui eveniment de invazie, au apărut ramificații diferențiate ale diferitelor organisme eucariote. Pe măsură ce evoluția celulelor gazdă a progresat , bacteriile însoțitoare *au suferit* și ele propriile modificări independente . Prima modificare a fost transferul multor gene de la bacteria invadatoare la nucleul gazdei . Produsele a acestor gene.

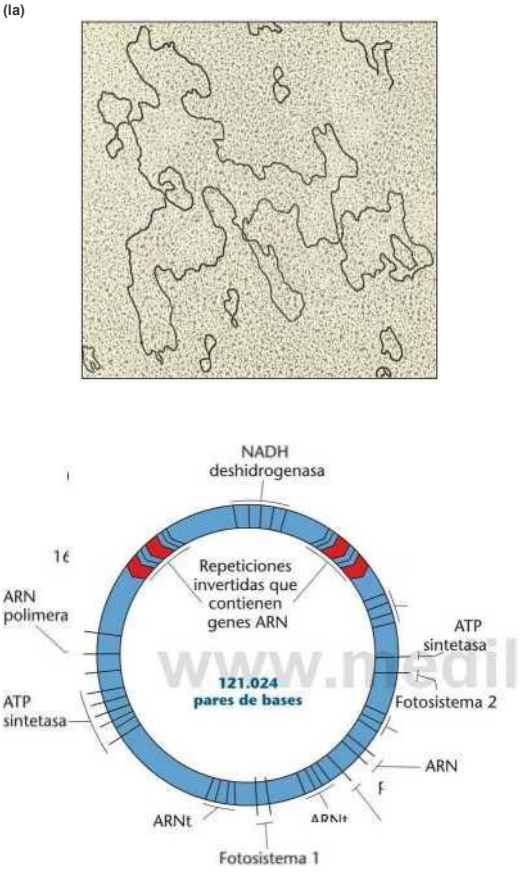


FIGURA 9.6 Ilustrarea ADN-ului cloroplastic, (a) Micrografie electronică a ADN-ului cloroplastic de salată verde, (b) Diagramă care ilustrează aranjamentul multora dintre genele codificate de ADN-ul cp al mușchiului *Marchantia polymorpha*. Fotosistemele 1 și 2 sunt grupuri de gene cu funcții fotosintetice.

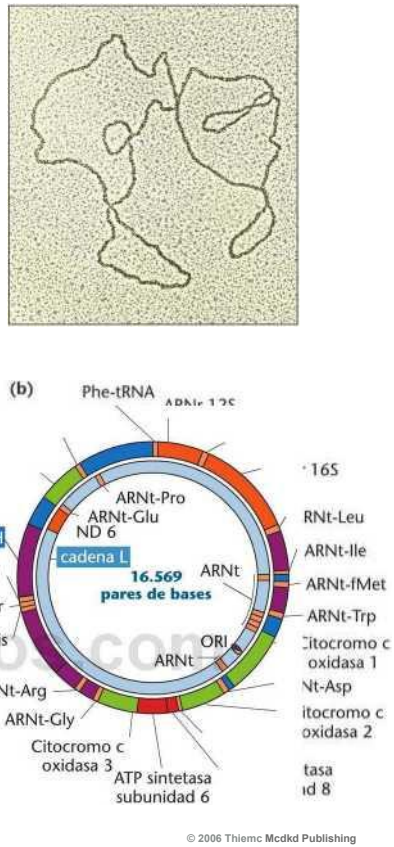


FIGURA 9.7 Exemple de ADN mitocondrial. (a) Micrografie electronică a ADN-ului mitocondrial de la broasca *Xenopus levis*. (b) Diagramă care ilustrează aranjamentul multora dintre genele codificate de ADN-ul mt uman.

Deși continuă să funcționeze în cadrul organitei, ele sunt acum codificate și transcrise în nucleu și traduse în citoplasmă înainte de a fi transportate la organită. Cantitatea de ADN care rămâne în genomul unei mitocondrii tipice este minusculă în comparație cu cea a - bacteriilor libere din care au derivat. Cele mai bogate organite în gene au acum mai puțin de 10% din genele prezente în cele mai mici bacterii cunoscute.

Schimbări similare au caracterizat evoluția doroplasticilor. În secțiunile următoare vom explora cu anumite detalii despre ceea ce se știe în prezent despre cloroplaste și mitocondrii.

Organizarea moleculară și produsele genetice ale ADN-ului doroplastic

Astăzi, detaliile sistemului genetic autonom al cloroplastului au fost determinate, oferind dovezi suplimentare că teoria endosimbiotică este corectă. Cloroplastul, responsabil pentru fotosinteză, are atât ADN (ca sursă de informații genetice), cât și un aparat complet de sinteză a proteinelor. Componentele moleculare ale aparatului de translație al cloroplastului derivă informații genetice atât din nucleu, cât și din organita însăși.

ADN-ul cloroplastic (cpDNA), prezentat în Figura 9.6, are dimensiuni destul de uniforme la diferite organisme, variind de la 100 la 225 kb în lungime. Acesta prezintă multe asemănări cu ADN-ul găsit în celulele procariote. Este circular și bicatenar și nu este asociat cu proteinele caracteristice ADN -ului eucariot . Comparativ cu ADN-ul nuclear din același organism, acesta prezintă invariabil o densitate diferită și o compoziție distinctă a bazelor.

Dimensiunea ADNcp este mult mai mare decât cea a ADNmt. Într-o oarecare măsură, acest lucru se datorează numărului mai mare de gene. Cu toate acestea, cea mai mare parte a acestei diferențe pare să se datoreze prezenței în ADNcp a multor secvențe nucleotidice - lungi necodificatoare , situate atât între , cât și în interiorul genelor. Aceste din urmă secvențe sunt numite introni (secvențe de ADN necodificatoare, caracteristice și ADN-ului nuclear la eucariote, așa cum vom vedea în Capitolul 13). Există, de asemenea, duplicări ale multor secvențe de ADN. Deoarece astfel de secvențe necodificatoare variază la diferite plante, acest lucru indică evoluția independentă care a avut loc în cloroplaste după invazia lor inițială de către o celulă primitivă de tip eucariot.

În alga verde *Chlamydomonas,* există aproximativ 75 de copii de ADN cloroplastic per organită. La plantele superioare , cum ar fi mazărea dulce, există, de asemenea, mai multe copii ale moleculei de ADN în fiecare organită, dar molecula (134 kb) este considerabil mai mică decât cea a *Chlamydomonas* (195 kb). Interesant este că recombinarea genetică între mai multe copii de ADN din cloroplaste a fost documentată la unele organisme .

Numeroși produși genetici codificați de ADN-ul dorsoplastic funcționează în timpul traducerii în cadrul organitei . Figura 9.6(b) ilustrează unele dintre genele prezente în ADN -ul cp al mușchiului, care este reprezentativ pentru un anumit grup de plante superioare . Sunt prezente două seturi de gene care codifică ARN-ul ribozomal - ARNr 16S și ARNr 23S (S se referă la coeficientul Svedberg, care este descris în Capitolul 10 și este legat de forma și dimensiunea - moleculei). În plus, ADN-ul cp codifică numeroase ARN-uri de transfer (ARNt), precum și multe proteine ribozomale specifice ribozomilor dorsoplastici. La hepatică, al cărei ADNcp este primul secvențiat , există gene care codifică 30 de tipuri de ARNt, ARN polimerază, ARNr multiple și numeroase proteine ribozomale. Variațiile produselor genetice codificate în ADN-ul cp al diferitelor plante indică din nou evoluția independentă care a avut loc în cloroplaste.

Ribozomii cloroplastici diferă semnificativ de cei din citoplasmă, care sunt codificați de gene nucleare. Aceștia au un coeficient Sverdberg puțin mai mic decât 70S, caracteristic ribozomilor bacterieni. Deși unele proteine ribozomale cloroplastice sunt codificate de ADN citoplasmatic (ADNcp) , iar altele de ADN nuclear , majoritatea, dacă nu toate, aceste proteine sunt diferite chimic de omologii lor din ribozomii citoplasmatici . Ambele observații oferă un sprijin direct pentru teoria endosimbiotică .

Au fost identificate și alte gene cloroplastice specifice funcției fotosintetice [Figura 9.6(b)]. De exemplu, în mușchi, există 92 de gene cloroplastice care codifică proteine care fac parte din membrana tilacoidă , o componentă celulară esențială pentru reacțiile fotosintetice dependente de lumină . Mutațiile acestor gene pot inactiva fotosinteza. O distribuție tipică a genelor între nucleu și cloroplast este ilustrată de una dintre principalele enzime fotosintetice, ribuloză-1-5-bisfosfat carboxilaza (cunoscută sub numele de *Rubisco).* Această enzimă are subunitatea mică codificată de o genă nucleară, în timp ce subunitatea mare este codificată de ADNcp.

- **ului mitocondrial Sunt** disponibile și informații extinse despre structura și produsele genetice ale ADN-ului mitocondrial (ADNmt). La multe eucariote, ADNmt este un cerc închis, bicatenar [Figura 9.7 (a)] care, la fel ca ADNcp, nu are proteinele cromozomiale caracteristice ADN -ului cromozomial eucariot. O excepție se găsește la unele protozoare ciliate, la care ADN -ul este liniar.

Dimensiunea ADN-ului mt este mult mai mică decât cea a ADN-ului cp și variază considerabil între organisme, așa cum se arată în Tabelul 9.1 . La o serie de animale, inclusiv la oameni , ADN-ul mt constă în aproximativ 16.000 până la 18.000 pb (16 până la 18 kb). Cu toate acestea, la drojdie *(Saccharomyces),* ADN-ul mt are 75 kb. Plantele depășesc de obicei această dimensiune - în mitocondriile mușțarului , Arabidopsis , Dimensiunea este de 367 kb. Vertebratele au 5 până la 10 molecule de astfel de ADN pe organită, în timp ce plantele au 20 până la 40 de copii pe organită.

Dimensiunea H a ADN-ului mitocondrial la diferite organisme

Organizații	Dimensiune (kb)
Homo sapiens (oameni)	16.6
Mus musculus (șoareci)	16.2
Xenopus laevis (broască)	18.4
Drosophila melanogaster (musca fructelor)	18.4
Saccharomyces cerevisiae (drojdie)	75,0
Pisum sativum (mazăre)	110,0
Arabidopsis thaliana (plantă de mușțar)	367,0

Pot fi evidențiate multe alte aspecte importante ale ADN-ului mitocondrial. Cu rare excepții, genele mitocondriale nu au introni, iar repetițiile genelor sunt rare. ADN-ul spacer intergenic este, de asemenea, mai puțin frecvent. Acest lucru este valabil mai ales la speciile cu ADN-ul mitocondrial considerabil mai mic, cum ar fi oamenii. Cu toate acestea, la *Saccharomyces,* cu molecula sa de ADN-ul mitocondrial mai mare, o mare parte din excesul de ADN este explicat de prezența intronilor și a ADN-ului spacer intergenic. După cum vom vedea în Capitolul 13, expresia genelor mitocondriale prezintă mai multe modificări în comparație cu codul genetic standard. De asemenea, este interesant de observat că replicarea în mitocondrii depinde de enzimele codificate de ADN-ul nuclear.

La om, ADN-ul mitocondrial [Figura 9.7(b)] codifică două ARN-uri ribozomale (ARNr), 22 de ARN-uri de transfer (ARNt) și 13 polipeptide esențiale pentru funcțiile respiratorii oxidative ale organitelor. De exemplu, produsele genetice codificate în mitocondrii sunt prezente în toate complexele proteice ale lanțului de transport al electronilor din membrana mitocondrială internă. În multe cazuri, aceste polipeptide fac parte din proteine multicatenare, multe dintre acestea conținând și subunități codificate în nucleu, sintetizate în citoplasmă și apoi transportate la organită. Astfel, sistemul de sinteză a proteinelor și componentele moleculare ale respirației celulare sunt derivate în comun din gene nucleare și mitocondriale.

O altă observație interesantă este că, în ADN-ul mitocondrial al vertebratelor, cele două catene au densități diferite atunci când sunt examinate prin centrifugare. Acest lucru oferă cercetătorilor o modalitate de a izola catenele pentru studiu, desemnând una ca fiind grea (H) și cealaltă ca fiind ușoară (L). Deși majoritatea genelor mitocondriale sunt codificate de catena H, unele sunt codificate de catena L complementară.

Așa cum ar putea prezice ipoteza endosimbiotică, ribozomii găsiți în organelă diferă de cei prezenți în citoplasma vecină . Ribozomii mitocondriali de la diferite specii variază considerabil în ceea ce privește coeficienții Svedberg, de la 55S la 80S, în timp ce ribozomii citoplasmatici au uniform 80S. Majoritatea proteinelor care funcționează în mitocondrii sunt codificate de gene nucleare. De fapt, există peste 1.000 de produse genetice codificate în nucleu care sunt esențiale pentru activitatea biologică a organelei. Acestea includ, de exemplu, ADN și ARN polimerazele, factorii de inițiere și elongație esențiali pentru translație, proteinele ribozomale, aminoacil-ARNt sintetazele și diverse alte tipuri de ARNt. Este important de subliniat faptul că aceste componente importate sunt distincte de omologii lor citoplasmatici , chiar dacă ambele grupuri sunt codificate de gene nucleare, oferind dovezi suplimentare pentru teoria endosimbiotică. De exemplu, enzimele sintetază esențiale pentru încărcarea moleculelor de ARNt mitocondrial (un proces fundamental pentru translație) prezintă o afinitate caracteristică pentru speciile de ARNt mitocondrial, spre deosebire de ARNt citoplasmatice. O afinitate similară a fost observată pentru factorii de inițiere și elongație. Mai mult, în timp ce ARN polimerazele bacteriene și nucleare sunt cunoscute ca fiind compuse din numeroase subunități, varietățile -mitocondriale constau dintr -un singur lanț polipeptidic . În general, această polimerază este sensibilă la antibioticele care inhibă sinteza ARN-ului bacterian , dar nu și la inhibitorii eucarioți. Figura 9.8 compară diferitele contribuții ale unora dintre produsele genetice nucleare și mitocondriale .

ACUM REZOLVĂ ASTA

9.3 La om , **ADN-ul mitocondrial** codifică 22 de molecule diferite de ARNt . Cu toate acestea , sunt necesare 32 de ARNt diferite pentru traducerea -proteinelor în mitocondrii . Explicați de ce.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea originii mitocondriilor la eucariote . Cheia rezolvării ei constă în luarea în considerare a teoriei endosimbiotice și a ramificațiilor acesteia .*

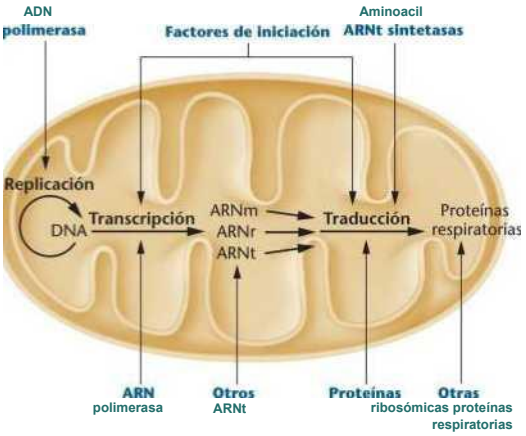


FIGURA 9.8 Produși genetici esențiali pentru funcția mitocondrială. Cei care intră în organită sunt derivați din citoplasmă *și* sunt codificați de gene nucleare.

9.3

Mutațiile ADN-ului mitocondrial duc la boli la specia umană

ADN -ul găsit în mitocondriile umane a fost complet secvențiat și constă din 16.569 de perechi de baze. Așa cum am menționat anterior, produsele genetice ale ADNmt includ 13 din cele peste 70 de proteine necesare pentru respirația celulară aerobă . Deoarece aprovizionarea cu energie celulară se bazează în mare măsură pe respirația celulară aerobă pentru a genera ATP, modificarea oricărei gene mitocondriale prin mutație poate avea un impact serios asupra organismului. Am văzut acest lucru în discuția noastră anterioară despre mutațiile *minore* la drojdie, care ar fi o mutație letală dacă nu ar exista capacitatea acestui organism de a respira anaerob. De fapt, ADNmt este deosebit de vulnerabil la mutații din două motive posibile. În primul rând, ADNmt nu are protecția structurală împotriva mutațiilor oferită de proteinele histone prezente în ADN-ul nuclear. În al doilea rând, mitocondriile concentrează specii reactive de oxigen (ROS) extrem de mutagene generate de respirația celulară. Într-un astfel de spațiu închis, ROS sunt toxice pentru conținutul organitei și se știe că deteriorează proteinele, lipidele și ADNmt. În cele din urmă, acest lucru duce la o frecvență crescută a delețiilor și mutațiilor punctuale în mitocondrii.

Numărul de copii de ADNmt din celulele umane poate varia de la câteva sute în celulele somatice până la aproximativ 100.000 de copii de ADNmt într-un ovocit. Din fericire, un zigot primește un număr mare de organite prin intermediul ovulului, așa că, dacă doar una sau foarte puține organite conțin o mutație, impactul acesteia este mult diluat de numeroasele mitocondrii cărora le lipsește mutația și funcționează normal. Cu toate acestea, în timpul dezvoltării timpurii, diviziunea celulară dispersează populația inițială de mitocondrii prezentă în zigot, iar în celulele nou formate, aceste organite se reproduc autonom. Prin urmare, dacă apare sau este prezentă o mutație dăunătoare în populația inițială de organite, adulții vor avea celule cu un amestec variabil de organite normale și anormale. Această variație a conținutului genetic al organitelor, așa cum s-a discutat anterior în capitol, se numește *heteroplasmie.*

Pentru a atribui o boală umană mitocondriilor modificate genetic, trebuie îndeplinite mai multe criterii:

1. Moștenirea ar trebui să prezinte un model matern mai degrabă decât unul mendelian .
2. Tulburarea trebuie să reflecte o deficiență a funcției bioenergetice a organitei.
3. Trebuie să existe o mutație specifică într-una sau mai multe gene mitocondriale.

Până în prezent, se știe că mai multe tulburări umane prezintă aceste caracteristici. De exemplu, sindromul de epilepsie miodonică cu fibre roșii zdrențuite (RRF-ME) prezintă un model de moștenire consistent din punct de vedere matern. Doar urmașii mamelor afectate moștenesc tulburarea; urmașii taților afectați sunt toți normali . - Persoanele cu această tulburare rară manifestă ataxie (lipsa coordonării musculare), surditate, demență și convulsii epileptice. Boala este numită astfel datorită prezenței fibrilelor musculare scheletice „zdrențuite și roșii" care prezintă pete roșii rezultate din proliferarea mitocondriilor aberante (Figura 9.9). Funcția creierului , care are, de asemenea, un ...

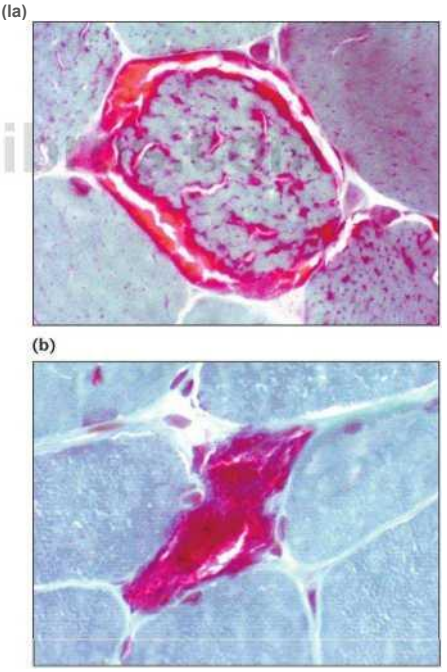


FIGURA 9.9 Miofibrile roșii zdrențuite ale celulelor musculare scheletice de la pacienți cu sindrom mitocondrial MERRF . (a) Fibrele musculare au o proliferare mitocondrială redusă . (Vezi marginile roșii și citoplasma pătată.) (b) Proliferare marcată în care mitocondriile au înlocuit majoritatea structurilor celulare .

În acest sindrom este afectat un necesar energetic ridicat, ducând la simptomele neurologice descrise.

Analiza ADN-ului mitocondrial (ADNmt) de la pacienți cu MERRF a relevat o mutație într-una dintre cele 22 de gene mitocondriale care codifică ARN-ul de transfer. Mai exact, gena care codifică ARNt 1'5 (ARNt -ul care furnizează lizină în timpul translației) are o tranziție AG în secvența sa. Această modificare interferează aparent cu capacitatea de translație din cadrul organitei, ceea ce, la rândul său, duce la diverse manifestări ale tulburării.

Celulele indivizilor afectați prezintă heteroplasmie, conținând un amestec de mitocondrii normale și anormale. Pacienți diferiți au proporții diferite ale celor două, ba chiar celule diferite de la același pacient prezintă niveluri variate de mitocondrii anormale. Fără heteroplasmie, mutația ar fi probabil letală, demonstrând natura esențială a funcției mitocondriale și dependența acesteia de genele codificate de ADNmt în cadrul organelei .

O a doua tulburare, neuropatia oculară ereditară Leber (LHON), prezintă, de asemenea, moștenire maternă și leziuni ale ADN-ului mitocondrial . Această tulburare este caracterizată prin orbire bilaterală bruscă. Vârsta medie a pierderii vederii este de 27 de ani, dar debutul acesteia este foarte variabil. Au fost identificate patru mutații, toate perturbând fosforilarea oxidativă normală, calea finală a respirației celulare. Peste 50% din cazuri rezultă dintr-o mutație la o poziție specifică a genei mitocondriale care codifică o subunitate a NADH dehidrogenazei. Această mutație este transmisă matern prin mitocondrii tuturor urmașilor. Interesant este că , în multe cazuri de LHON , nu există antecedente familiale; un număr semnificativ de cazuri sunt „sporadice", rezultând din mutații noi.

Persoanele grav afectate de o a treia tulburare, sindromul Kearns-Sayre (KSS), prezintă pierderea vederii, pierderea auzului și probleme cardiace. Baza genetică a KSS implică deleții în diferite puncte ale ADN-ului mitocondrial (ADNmt). Mulți pacienți cu KSS sunt asimptomatici în copilărie , dar dezvoltă progresiv mai multe simptome la vârsta adultă. Proporția crescută de ADNmt cu mutații de deleție duce la o severitate mai mare a simptomelor.

Mitocondriile, sănătatea umană și îmbătrânirea

Studiul tulburărilor moștenite mitocondriale oferă perspective asupra importanței enorme a acestei organite în timpul dezvoltării normale. De fapt, disfuncția mitocondrială pare a fi implicată în aproape toate tulburările majore, inclusiv diabetul de tip 1 (cu debut tardiv) ; ateroscleroza ; boli neurodegenerative precum Parkinson, Alzheimer și boala Huntington ; schizofrenia și tulburările bipolare ; și diverse tipuri de cancer. Devine din ce în ce mai clar, de exemplu, că mutațiile ADN -ului mitocondrial (ADNmt) sunt prezente în boli umane precum cancerul de piele, colorectal, hepatic , mamar, pancreatic, pulmonar, de prostată și de vezică urinară. Au fost dezvoltate teste genetice pentru a detecta mutații în genomul ADNmt , care pot servi drept markeri pentru boală într-un stadiu incipient. De exemplu, au fost detectate mutații ale ADNmt în celulele pielii , care pot fi utilizate ca biomarkeri pentru expunerea cumulativă la lumina ultravioletă și dezvoltarea cancerului de piele. Cu toate acestea, încă nu este clar dacă mutațiile ADNmt sunt un factor care contribuie la dezvoltarea tumorilor maligne sau , dimpotrivă , o consecință a formării tumorii. În orice caz, există o legătură interesantă între mutațiile ADN-ului mt și cancer , inclusiv date care sugerează că mulți agenți cancerigeni chimici au efecte mutagene semnificative asupra ADN-ului mt.

Studiul bolilor ereditare mitocondriale a sugerat, de asemenea, o legătură între declinul progresiv al funcției mitocondriale și procesul de îmbătrânire . S-a emis ipoteza că acumularea de mutații sporadice în ADNmt duce la o prevalență crescândă a mitocondriilor defecte (cu o reducere consecutivă a aportului de ATP) în celule în timp. Această afecțiune, la rândul ei, joacă un rol semnificativ în procesul de îmbătrânire . S - a sugerat că celulele necesită un nivel prag de producție de ATP , rezultat din fosforilarea oxidativă , pentru a funcționa normal. Când nivelul scade sub acest prag, procesul de îmbătrânire se accelerează .

Numeroase studii au documentat acum faptul că țesuturile îmbătrânite conțin mitocondrii cu niveluri mai ridicate de deteriorare a ADN-ului. Ca și în cazul cancerului, principala întrebare este dacă astfel de modificări sunt pur și simplu biomarkeri ai procesului de îmbătrânire sau dacă duc la o reducere a funcției fiziologice care contribuie semnificativ la această îmbătrânire. În sprijinul acestei ultime ipoteze, un studiu leagă atrofia fibrelor musculare legate de vârstă la șobolani cu deleții de ADNmt și anomalii în transportul de electroni. Astfel de deleții par a fi prezente în fibrele mușchilor atrofiați , în timp ce sunt absente în fibrele din regiunile țesutului normal . Un alt studiu care a utilizat șoareci modificați genetic este și mai convingător . Acești șoareci au o genă nucleară modificată care reduce funcționarea mecanismelor de corectură în timpul replicării ADNmt . În consecință, acești șoareci prezintă o fidelitate de replicare mai mică și acumulează mutații în timp la o rată mult mai mare decât în mod normal. Acești șoareci prezintă , de asemenea ...

multe caracteristici ale îmbătrânirii premature, cum ar fi căderea și albirea părului, reducerea densității osoase și a masei musculare , fertilitatea redusă , anemia și o durată de viață mai scurtă .

Aceste studii, precum și altele, continuă să sublinieze importanța generării corecte de ATP ca urmare a fosforilării oxidative, sub conducerea ADN - ului conținut în mitocondrii . Pe măsură ce celulele suferă leziuni genetice, ceea ce pare a fi un fenomen natural, funcția lor scade, ceea ce poate fi unul dintre factorii care cauzează îmbătrânirea , precum și progresia bolilor legate de vârstă .

ACUM REZOLVĂ ASTA

9.4 Având în vedere originea maternă a mitocondriilor, care sunt transmise de la mamă la urmași prin intermediul ovulului, și luând în considerare rata relativ ridicată de mutație a ADN-ului mitocondrial , ne-am putea aștepta ca un procent ridicat de mitocondrii mutate, nefuncționale, să se acumuleze în celulele adulte . De asemenea, ne-am putea imagina că, ca urmare, o catastrofă mitocondrială s-ar produce în cele din urmă, de-a lungul generațiilor. Cu toate acestea, nu se întâmplă acest lucru , iar datele indică faptul că, de-a lungul generațiilor, mutațiile ADN-ului mitocondrial tind să scadă în frecvență în fiecare linie genetică luată în considerare. Cum poate fi explicat acest fenomen?

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea heteroplasmiei din mitocondrii. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a factorilor care determină evoluția, în special selecția naturală, și aplicarea acestui concept la prezența mai multor mitocondrii în fiecare celulă.*

Pigmentarea în *Efesia*

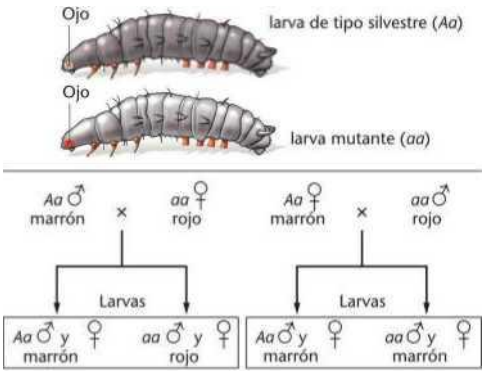
Un exemplu foarte direct al efectului matern poate fi observat la molia mediteraneană a făinii, *Ephestia kuehniella.* Larvele de tip sălbatic ale acestei molii au o cuticulă pigmentată și ochi căprui , ca urmare a genei dominante A. Pigmentul provine dintr-o moleculă precursoare , kinurenina, care la rândul ei este derivată din aminoacidul triptofan. O mutație *a,* Aceasta perturbă sinteza kinureninei și, în homozigoție, are ca rezultat larve cu ochi roșii și pigmentare redusă. Cu toate acestea , așa cum este ilustrat în Figura 9.10, rezultatul încrucișării *Aa x aa* depinde de părintele care poartă alela dominantă. Când masculul este heterozigot, se observă un raport de 1:1 între ochi căprui și roșii în rândul larvelor , așa cum este prezis de segregarea mendeliană. Cu toate acestea, atunci când femela este heterozigotă pentru gena A, toate larvele sunt pigmentate și au ochi căprui, chiar dacă jumătate dintre ele sunt *aa.* Pe măsură ce aceste larve ajung la vârsta adultă, jumătate dezvoltă treptat ochi roșii, restabilind raportul 1:1.

O explicație pentru aceste rezultate este că ovocitele *Aa* sintetizează kinurenină, o enzimă necesară sintezei lor, care se acumulează în ovoplasmă înainte de finalizarea meiozei. Chiar și la urmașii din specia Aa , ale căror mame au fost *Aa* , acest pigment este distribuit în citoplasma celulelor larvare în curs de dezvoltare ; astfel, acestea dezvoltă pigmentare și ochi căprui. Cu toate acestea, la acești urmași, pigmentul este diluat printre numeroasele celule și consumat, rezultând ochi roșii la adult. Exemplul lui *Ephestia* demonstrează efectul matern al unui produs genetic nuclear stocat în citoplasmă, care influențează fenotipul larvar și, cel puțin temporar , predomină asupra genotipului urmașului.

9.4

En el efecto materno, el genotipo de la madre tiene gran influencia en el desarrollo temprano

El efecto materno, también llamado *influencia materna,* implica que el fenotipo de un descendiente para un carácter dado está bajo el control de productos génicos nucleares presentes en el huevo. Esto contrasta con la herencia bipa- rental, en donde ambos padres transmiten la información de genes nucleares que determinan el fenotipo del descendiente. En los casos de efecto materno, los genes nucleares del gameto de la hembra se transcriben y los productos génicos (proteínas o ARNm no traducido) se acumulan en el citoplasma del óvulo. Después de la fecundación, estos productos se distribuyen entre las nuevas células formadas e influyen en los patrones o caracteres establecidos durante el desarrollo temprano. Tres ejemplos ilustrarán tal influencia del genoma materno sobre caracteres concretos.



AGURA 9.10 Influencia materna en la herencia de la pigmentación del ojo en la polilla de la harina *Ephestia kuehniella.* En cada lado de la parte anterior de la larva hay estructuras (ojos) múltiples para la recepción de la luz.

Înfășurare în *Limnaea*

Răsucirea cochiliei la melcul *Limnaea peregra* este un exemplu excelent de efect matern care prezintă un fenotip permanent, mai degrabă decât tranzitoriu. Unele tulpini ale acestui melc au răsucirea cochiliei spre stânga , sau levorotatorie *(dd),* în timp ce altele o au spre dreapta , sau dextrogitatorie *(DD* sau *Dd).* Acești melci sunt hermafrodiți și pot prezenta fertilizare încrucișată sau autofertilizare, permițând o mare varietate de tipuri de împerechere.

Figura 9.11 ilustrează rezultatele încrucișărilor reciproce între melci de rasă pură. După cum se poate observa, aceste încrucișări produc rezultate distincte, chiar dacă ambele încrucișări sunt între organisme dextrogitatoare și levorgitatoare și produc urmași care sunt toți heterozigoți. Examinarea urmașilor relevă faptul că fenotipurile lor depind de genotipul melcului donator de ouă. Dacă adoptăm această concluzie ca ipoteză de lucru, o putem testa examinând urmașii în generații succesive de autofertilizare. În

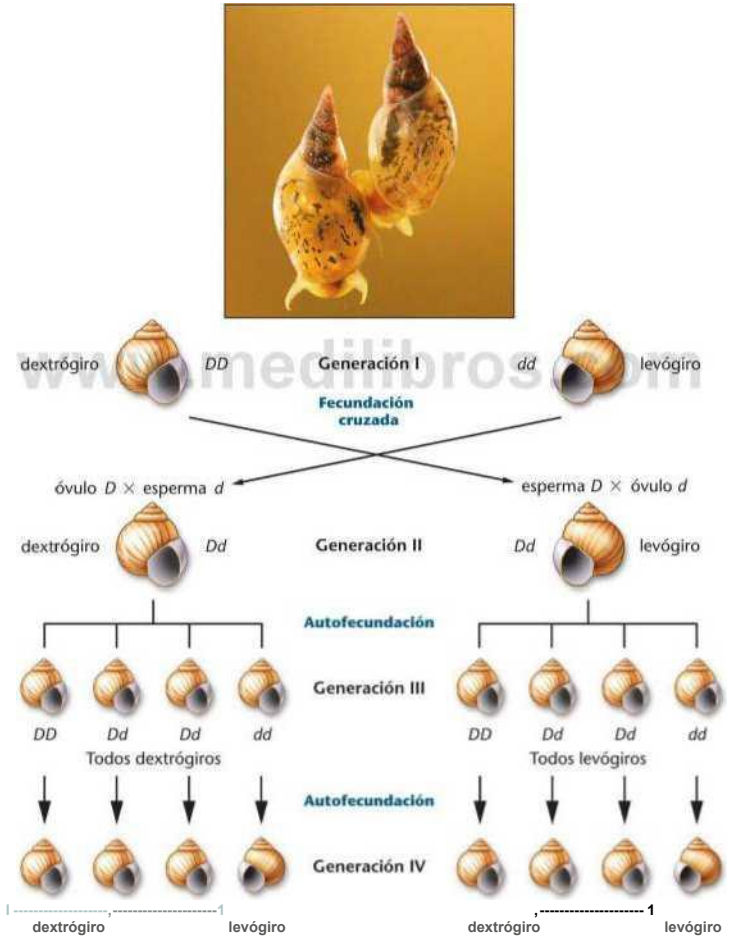


FIGURA 9.11 Herencia del enrollamiento del caracol *Limnaea peregra.* El enrollamiento es dextrógiro (hacia la derecha) o levógiro (hacia la izquierda). El efecto materno es evidente en las generaciones II y III, en donde el genotipo de la madre, en lugar del propio genotipo de los descendientes, condiciona el fenotipo de estos. La fotografía ilustra un caracol enrollado hacia la derecha y otro hacia la izquierda.

fiecare caz , ipoteza este valabilă. Donatoarele de ouă care sunt *dd* produc doar urmași cu încolăcirea stângă. Modelul de încolăcire al urmașilor este determinat de *genotipul părintelui producător de ouă, indiferent de fenotipul acelui părinte.*

Cercetările privind dezvoltarea la *Limnaea* arată că orientarea fusului ovarelor în timpul primei diviziuni mitotice după fertilizare determină direcția de înfășurare. Orientarea fusului pare a fi controlată de genele materne care acționează asupra dezvoltării ovulelor în ovar . La rândul său, orientarea fusului influențează diviziunile celulare după fertilizare și stabilește modelul permanent de înfășurare la adult. Alela dextrogitară (D) sintetizează un produs genetic activ care are ca rezultat înfășurarea dreaptă. Dacă ooplasma din ouăle dextrogitare este injectată în ouă levorogitare nedivizate , acestea se divid conform unui model dextrogitar. Cu toate acestea, în experimentul invers, ooplasma levorogitară nu are niciun efect atunci când este injectată în ouăle dextrogitare. Aparent , alela levorogitară este rezultatul unei mutații recesive clasice care codifică un produs genetic inactiv.

Putem concluziona atunci că melcii *DD* sau *Dd* produc ovocite care sintetizează produsul genetic D , care este stocat în ooplasmă. Chiar dacă după meioză ovocitul are doar alela *d* și este fertilizat de un spermatozoid < 7, melcul dd rezultat va avea încolăcirea pe partea dreaptă.

Dezvoltarea embrionară la *Drosophila*

Un exemplu documentat mai recent al unui efect mater nu implică mai multe gene care controlează dezvoltarea embrionară la *Drosophila melanogaster.* Controlul genetic al *dezvoltării embrionare a Drosophila,* discutat mai detaliat în Capitolul 18, este o poveste fascinantă . Produșii proteici ai genelor cu efect matern funcționează prin activarea altor gene, care la rândul lor activează alte gene. Această cascadă de activitate genică are ca rezultat un embrion normal, care ulterior se dezvoltă într-o muscă adultă normală. Munca exhaustivă a lui Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard și Eric Wieschaus (care au împărțit Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 1995 pentru descoperirile lor) a clarificat modul în care funcționează aceste gene și altele. Genele care ilustrează efectul matern au produși care sunt sintetizați în ovulul în curs de dezvoltare și stocați în ovocit înainte de fertilizare. După fertilizare, acești produși specifică gradienți moleculari care determină organizarea spațială pe măsură ce dezvoltarea progresează .

De exemplu, gena *bicoidă (baT)* Ea joacă un rol important în specificarea dezvoltării părții anterioare a muscii. ARN-ul transcris de această genă se acumulează în regiunea anterioară a oului (Figura 9.12) și, după traducere , formează un gradient care este cel mai înalt la capătul anterior și scade treptat spre capătul posterior . Embrionii derivați de la mame homozigote pentru alela mutantă *(bcd~lbcd~i)* nu dezvoltă partea anterioară care dă naștere în mod normal capului și toracelui la musca adultă . Embrionii ale căror mame au cel puțin o alelă de tip sălbatic *(pat)* . Acestea se dezvoltă normal , chiar și atunci când genotipul embrionului este homozigot pentru mutație. În concordanță cu conceptul de *efect matern , genotipul mamei , nu cel al embrionului,* determină fenotipul urmașului . Nüsslein-Volhard și Wieschaus, utilizând sortarea mutanților la scară largă, au descoperit multe alte gene cu efect matern esențiale pentru dezvoltarea normală la *Drosophila , care* influențează nu numai morfogeneza anterioară și posterioară , ci și expresia genelor zigotice (nucleare) care controlează segmentarea la acest artropod. Când vom reveni la acest subiect în Capitolul 18 , vom vedea exemple de alte gene care ilustrează efectul matern care influențează atât morfogeneza anterioară, cât și cea posterioară . Multe dintre aceste gene funcționează pentru a regla expresia spațială a genelor zigotice (nucleare) care influențează alte aspecte ale dezvoltării și se comportă genetic într-o manieră mendeliană.

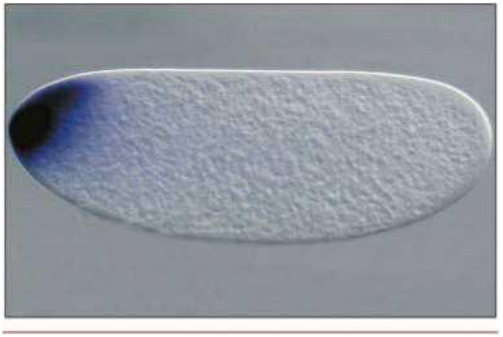


FIGURA 9.12 Un gradient de ARNm *bicoid* care arată cum este concentrat în regiunea anterioară a embrionului *de Drosophila* în timpul dezvoltării incipiente.

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

ADN-ul mitocondrial și misterul Romanovilor

ȘI

În 1917, după peste 300 de ani de domnie Romanov în Imperiul Rus și o violentă revoluție bolșevică , ultimul suveran Romanov a abdicat de la tron. Țarul Nicolae al II-lea, soția sa, țarina Alexandra , și cei cinci copii ai lor (Olga, Tatiana, Maria, Anastasia și Alexei) au fost arestați și trimiși în exil în orașul Ekaterinburg, situat în vestul Siberiei. Acești au fost însoțiți de medicul de familie și de trei servitori loiali.

Imediat după miezul nopții , pe 17 iulie 1918 , grupul a fost trezit și dus într -o cameră de la subsol , unde li s-a spus că vor fi mutați într -un loc mai sigur . În schimb , unsprezece bărbați cu revolvere au dat buzna în cameră și au deschis focul asupra familiei și a servitorilor lor . Pentru a finaliza execuția , și-au înfipt baionetele în corpuri și le-au zdrobit fețele cu paturile puștilor . Apoi, au încărcat cadavrele într -o căruță și le-au aruncat într -un puț de mină . Două zile mai târziu, cadavrele au fost recuperate din puțul de mină și îngropate în morminte puțin adânci în pădure . Acolo au rămas mai bine de 60 de ani .

Foarte curând, crimele Romanov au fost învăluite în mister . Deoarece locul lor de înmormântare era necunoscut și existau puțini martori oculari la crime, au apărut speculații cu privire la faptul dacă vreunul - sau poate toți - membrii familiei ar fi putut supraviețui. S- au dezvoltat mituri romantice despre posibila - supraviețuire a celei mai mici fiice , Anastasia (17) , și a moștenitorului tronului , Alexei (13), ambii despre care se spunea că scăpaseră din Rusia și așteptau ca drepturile lor la tronul imperial să le fie restabilite. Din 1918, peste 200 de persoane au pretins că sunt Marea Ducesă Anastasia.

Misterul Romanovilor a început să se dezlege în 1979, când un geolog siberian a descoperit patru cranii într -un mormânt puțin adânc din apropierea orașului Ekaterinburg. În vara anului 1991, după apariția glasnostului în Uniunea Sovietică, au început lucrările *de* exhumare . În total, au fost recuperate aproape 1.000 de fragmente osoase, care au fost folosite pentru a reconstrui nouă schelete: cinci de femei și patru de bărbați. Pe baza măsurătorilor osoase și prin suprapunerea craniilor pe fotografii folosind tehnologia computerizată, rămășițele au fost identificate provizoriu ca aparținând Romanovilor uciși și a patru membri ai personalului lor casnic. Dar lipseau două cadavre - cel al uneia dintre fiice și cel al tânărului Alexei.

Următorul pas în autentificarea rămășițelor a implicat analiza ADN-ului . Obiectivele au fost de a stabili relații familiale între rămășițe și apoi de a determina , prin comparație cu rudele în viață, dacă grupul familial era într-adevăr Romanov . Oamenii de știință au extras cantități mici de ADN din fragmente osoase ale fiecăruia dintre cele nouă schelete. Analiza ADN-ului genomic a confirmat relațiile familiale dintre un bărbat și o femeie adulți (presupușii părinți) și trei tinere femei. Analiza ADN-ului a patru dintre scheletele adulte a relevat că aceștia nu erau înrudiți între ei sau cu grupul familial.

După analizarea ADN-ului nuclear, oamenii de știință au analizat ADN-ul mitocondrial - (ADNmt). Deoarece mitocondriile sunt - moștenite strict de la mamă la urmași , secvențele de ADNmt pot fi utilizate pentru a urmări linia maternă fără efectele complicate ale încrucișării meiotice. Oamenii de știință au determinat secvențele nucleotidice a două regiuni extrem de variabile ale ADNmt din toate cele nouă probe osoase.

Secvențele presupusei țarine Alexandra se potriveau perfect cu cele ale prințului Filip al Angliei, care este strănepotul ei, permițând verificarea identității sale. Cu toate acestea, autentificarea țarului era mai complicată.

Secvențele de ADN mitocondrial (ADNmt) ale țarului au fost comparate cu cele ale singurelor două rude în viață care au putut fi convinse să participe la studiu : contesa Xenia Cheremeteff-Sfiri (stră-strănepoata sa) și James George Alexander Bannerman Carnegie, al treilea duce de Fife (o rudă mai îndepărtată, descendentă din femei strâns înrudite cu bunica țarului). Aceste comparații au surprins . La poziția 16.169 a ADNmt al țarului , se părea că exista fie o bază, fie alta, un C sau un T. Cu toate acestea , contele și ducele aveau doar un T în această poziție. Concluzia a fost că țarul Nicolae avea două populații distincte de mitocondrii în celulele sale, fiecare cu o bază diferită la poziția 16.169 a ADN-ului său. Se crede acum că această afecțiune , numită heteroplasmie, apare la 10 până la 20 % dintre oameni . Pentru a clarifica discrepanța dintre ADN-ul mitocondrial al țarului și cel al rudelor sale în viață , guvernul rus a acordat permisiunea de a analiza rămășițele fratelui mai mic al țarului , Marele Duce Gheorghi Romanov, care a murit în 1899 de tuberculoză . ADN-ul mitocondrial al Marelui Duce conținea aceeași variantă heteroplasmică la poziția 16169. Prin urmare, s-a concluzionat că oasele din Ekaterinburg aparțineau familiei imperiale cu soartă nefericită. După rezolvarea controversei de lungă durată , rămășițele autentificate ale țarului Nicolae al II- lea , ale țarinei Alexandra și ale a trei dintre fiicele lor au fost înmormântate în Catedrala Petru și Pavel din Sankt Petersburg pe 17 iulie 1998 , exact la optzeci de ani de la uciderea lor.

Rândul tău

I. Acordați -vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Investigați referințele și linkurile furnizate pentru a încerca să înțelegeți unele dintre tehnologiile și problemele legate de identificarea familiei Romanov .

1. În 2007, un al doilea mormânt a fost descoperit lângă groapa comună Romanov . Acest mormânt conținea rămășițele unui băiat și ale unei fete adolescente, conform relatărilor martorilor oculari din 1918, care au declarat că Alexei și una dintre surorile sale fuseseră îngropați în apropiere, după o încercare nereușită de incinerare a corpurilor lor. Erau acestea rămășițele ultimilor doi Romanovi?

Citiți despre analizele ADN criminalistice efectuate pentru a încerca să identificați aceste rămășițe în Coble, MD și colab., 2009. Mister rezolvat: identificarea celor doi copii Romanov dispăruți folosind analiza ADN. PLoS ONE 4:1-9.

2. Una dintre cele mai faimoase persoane care au pretins că sunt Marea Ducesă Anastasia a fost Anna Anderson, care a murit în Statele Unite în 1984. Ce tipuri de analize ADN au fost folosite pentru a verifica adevărata identitate a Annei Anderson și care au fost concluziile acelor studii?

Începeți-vă cercetarea citind Stoneking, M. și colab., 1995. Stabilirea identității Annae Anderson Manahan. Nature Genet. 9: 9-10.

3. Alexei Romanov suferea de hemofilie , moștenită de la mama sa, care o moștenise de la regina Victoria a Angliei. Istoricii cred că această afecțiune a contribuit la succesul Revoluției Ruse și la răsturnarea Romanovilor. Explicați motivele acestei idei și baza genetică a bolii sale.

Două explicații interesante ale „Bolii Regale" și ale modului în care hemofilia lui Alexei a influențat istoria pot fi găsite în Rogaev, El , et al. 2009. Analiza genotipului identifică cauza „Bolii Regale". *Science* 326: 817 și *în Alexei Nikolaevich,* **Țarevici** al Rusiei, la http://en.wikipedia.org/wiki/Alexei..Nikolaevich,_Tsarevich_of_Russia

L. STUDIU DE CAZ | O diferență între gemeni

Știrile recente despre „misterioasa boală a celulelor mitocondriale" a unui jucător profesionist de baseball (Rocco Baldelli de la Tampa Bay Rays) nu numai că au oferit clarificări personale pentru o pereche de gemeni identici , dar au crescut și gradul de conștientizare a publicului cu privire la o serie de boli similare care afectează mii de copii și adulți, indiferent de vârstă , sex, rasă sau statut social . Timp de 14 ani, cei doi frați au concurat de la egal la egal, până când unul a început să experimenteze o pierdere a acuității vizuale și a masei musculare. A fost diagnosticat cu o tulburare mitocondrială care explica cauza simptomelor sale și i s-au prescris îngrijiri paliative, dar au apărut și câteva întrebări importante .

1. Părinții gemenilor și alte rude erau aparent sănătoși, așa că cum ar fi putut apărea această tulburare genetică?
2. Cum este posibil ca unul dintre gemenii identici să aibă o boală mitocondrială ereditară, iar celălalt să nu?
3. Poate fi garantat fratelui neafectat că va continua să se bucure de o sănătate bună?

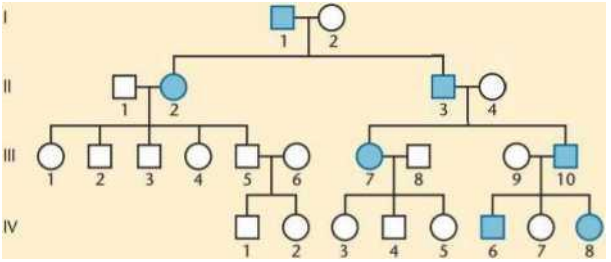
Puntos de resumen

1. Modelele de moștenire diferă uneori de cele așteptate în cazul transmiterii biparentale a genelor nucleare. În astfel de cazuri, -fenotipurile par adesea să rezulte din informațiile genetice transmise prin ooplasma ovulului .
2. Moștenirea organitelor se bazează pe genotipurile de ADN ale cloroplastelor și mitocondriilor, pe care aceste organite le transmit -urmașilor lor. Mutațiile din cloroplaste afectează capacitatea fotosintetică a plantelor, în timp ce mutațiile mitocondriale afectează celulele care depind în mare măsură de energia (ATP) generată în timpul respirației celulare . Mutanții rezultați prezintă fenotipuri asociate cu pierderea funcției acestor organite.
3. Atât cloroplastele, cât și mitocondriile au apărut pentru prima dată în celulele eucariote primitive acum aproximativ 2 miliarde de ani, când au fost invadate de protobacterii, care apoi au coevoluat cu celula gazdă conform teoriei endosimbiotice. Dovezile care susțin această ipoteză endosimbiotică sunt abundente și se concentrează pe numeroase observații ale ADN -ului și ale mecanismului genetic prezent în prezent în cloroplaste și mitocondrii.
4. Mutațiile din ADN-ul mt uman sunt cauza principală a diferitelor tulburări genetice ereditare la specia umană.
5. Modelele de efecte materne apar atunci când produsele genelor nucleare exprimate de genotipul matern al ovulului influențează dezvoltarea timpurie . Exemplele includ pigmentarea la *Ephestia*. Înfășurarea cochiliei la melci și expresia genelor în timpul dezvoltării timpurii la *Drosophila*.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Analizați următoarea genealogie ipotetică, oferiți cea mai coerentă interpretare a modului în care este moștenită trăsătura și comentați orice - inconsecvențe.



Soluție. Trăsătura este transmisă de la toți masculii afectați la toți urmașii lor, cu excepția unuia, dar nu este *niciodată* transmisă de femele. Individul IV-7 (o femelă) este singura excepție.

2. Poate fi atribuită explicația pentru soluția anterioară unei gene de pe cromozomul Y? Explicați răspunsul.

Soluție: Nu, deoarece bărbații își transmit caracterul fiicelor lor la fel cum le transmit fiilor lor.

3. Este genealogia de mai sus un exemplu de efect patern sau de moștenire paternă?

Soluție. Are toate caracteristicile moștenirii paterne , deoarece masculii transmit trăsătura aproape tuturor urmașilor lor. Pentru a determina dacă trăsătura se datorează unui efect patern (o consecință a unei gene nucleare din gameții masculini), ar fi necesară analizarea încrucișărilor suplimentare.

Probleme și întrebări pentru discuții

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor , vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

DE CUM ȘTIM?

1. , ne-am concentrat pe moștenirea nucleară și pe modul în care trăsăturile pot fi determinate de informațiile genetice conținute în mitocondrii și cloroplaste și am explicat modul în care expresia genotipurilor materne poate afecta fenotipul unui organism. În același timp, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați propune la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum s-a stabilit că anumite fenotipuri sunt moștenite ca urmare a informației genetice prezente în cloroplast , mai degrabă decât în nucleu?
   (b) descoperirea a trei categorii de mutații *minore* la drojdie pe cercetători să postuleze moștenirea extranucleară a dimensiunii coloniilor ?
   (c) Ce observații susțin teoria endosimbiotică?
   (d) Ce observații cheie din încrucișările dintre melci cu încolăcire dreaptă și stângă susțin explicația că acest fenotip este rezultatul moștenirii prin efect matern ?
   (e) Ce descoperiri demonstrează că efectul matern este baza unui anumit mod de moștenire?
2. Ce criterii genetice disting un caz de moștenire transnucleară de un caz de moștenire autosomală mendeliană? Și de un caz de moștenire legată de cromozomul X ?
3. Rezistența la streptomicină la Chlamydomonas Aceasta poate rezulta dintr-o mutație a unei gene cloroplastice sau a unei gene nucleare. Ce rezultate fenotipice ar apărea într-o încrucișare între un membru al unei tulpini *mt* rezistente la ambele tipuri de gene și un membru al unei tulpini sensibile la antibiotice ? Ce rezultate ar fi așteptate în încrucișarea reciprocă ?
4. O plantă poate avea frunze verzi, albe sau verzi și albe (pestrițe) pe ramuri datorită unei mutații a cloroplastelor care împiedică dezvoltarea culorii. Preziceți rezultatele următoarelor încrucișări :

Originea ovulului		Originea polenului
(a) Ramură verde	X	Ramură albă
(b) Ramură albă	X	Ramură verde
(c) Ramură pestriță	X	Ramură verde
(d) Ramură verde	X	Ramură pestriță

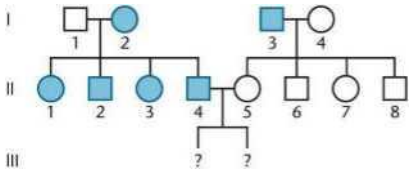
5. În tulpinile de drojdie diploide, sporularea și meioza ulterioară pot duce la ascospori haploizi, care pot

fuziona pentru a restaura celulele diploide. Când ascosporii dintr-o tulpină *segregațională mică* fuzionează cu cei dintr-o tulpină de tip sălbatic, toți zigoții diploizi sunt normali. După meioză , ascosporii sunt mici și normali. Fenotipul *segregațional mic este* moștenit ca trăsătură dominantă sau recesivă ?

6. Preziceți rezultatele unei încrucișări între ascosporii dintr-o tulpină *mică segregațională* și o tulpină mică neutră . Indicați fenotipul zigotului și ascosporilor care pot fi produși.
7. La *Lintnaea,* ce rezultate s-ar aștepta de la o încrucișare între un melc spiralat dreptaci *(Dd)* și un melc spiralat stângaci *(Dd),* presupunând că are loc fertilizarea încrucișată , așa cum se arată în Figura 9.11? Ce rezultate s-ar obține dacă melcul spiralat dreptaci *(Dd) ar produce doar ouă, iar* melcul spiralat stângaci *(Dd)* ar produce doar spermă?
8. Într-o încrucișare cu *Limnaea,* melcul care a contribuit cu ouăle a fost dextrogir, dar de genotip necunoscut. Fenotipul și genotipul celuilalt melc au fost necunoscute. Toți urmașii din F1 au prezentat încolăcire dextrogiră. Zece melci din F2 au fost lăsați să se autofecundeze. Jumătate au produs doar urmași dextrogirați, în timp ce cealaltă jumătate a produs doar urmași levorogirați. Care au fost genotipurile părinților?
9. La *Drosophila subobscura,* prezența unei gene recesive numite grandchildless *(* gs) are ca rezultat sterilizarea urmașilor femelelor homozigote , dar nu ai masculilor homozigoți. Puteți propune o explicație pentru motivul pentru care femelele , dar nu și masculii , sunt afectate de gena mutantă?
10. Un șoarece mascul dintr-o rasă pură de animale hiperactive a fost încrucișat cu o femelă dintr -o rasă pură de animale apatice (aceste două tulpini sunt ipotetice). Toți urmașii au fost apatici. În generația F2, toți urmașii au fost apatici . Care este cea mai bună explicație genetică pentru aceste date? Propuneți o încrucișare pentru a vă testa explicația.
11. Să luăm în considerare cazul în care o mutație perturbă traducerea într- o singură mitocondrie umană situată în ovocitul implicat în fertilizare . Care este posibilul impact al acestei mutații asupra urmașilor care vor apărea din acest ovocit?
12. Ce este teoria endosimbiotică și de ce este această teorie relevantă pentru studiul ADN-ului extranuclear în organitele eucariote?
13. La întrebarea 33 din secțiunea „Probleme și subiecte de discuție" din Capitolul 7 , am descris CC, felina creată prin clonare prin transfer nuclear, în care nucleul diploid al unei celule este injectat într-un ou din care nucleul a fost îndepărtat , pentru a crea un embrion. Până în prezent, vacile, oile, șobolanii, câinii și alte câteva specii au fost clonate folosind nuclei de celule somatice . Embrionii și adulții obținuți prin această tehnică prezintă adesea diverse defecte mitocondriale. Explicați posibilele motive pentru prevalența defectelor mitocondriale la embrionii creați prin clonare prin transfer nuclear .

Problemas extrapicantes

14. Specificarea axei anteroposterior a embrionilor de *Drosophila* este inițial controlată de mai multe produse genetice care sunt sintetizate și stocate în timpul ovogenezei în ovulul matur. Mutația acestor gene duce la anomalii ale axei în timpul embriogenezei. Aceste mutații sunt un exemplu de efect matern. Cum diferă aceste mutații de cele care implică moștenirea organelelor, ilustrând moștenirea citoplasmatică? Proiectați o serie de încrucișări paralele și rezultatele așteptate care implică gene mutante pentru a contrasta efectul matern și moștenirea citoplasmatică.
15. Mutația *bicoid (bed) ca efect matern* este recesivă. În absența - produsului proteic *bicoid ,* embriogeneza nu este completă. Să luăm în considerare o încrucișare între o femelă heterozigotă pentru *bicoid (bcd $^{+}$/bcd~)* și un mascul homozigot pentru mutația *(bed'/bed').*
    (a) Cum este posibil ca un bărbat să fie homozigot pentru mutație?
    (b) Preziceți rezultatul (embriogeneză normală versus avortată) în generațiile Fj și F2 ale încrucișării anterioare.
16. Următoarea este o genealogie a unui labirint ipotetic din specia umană:



Pentru a vizualiza *problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com*

Analizați pedigree-ul și propuneți o explicație genetică pentru natura tulburării. Pe baza explicației dvs. , preziceți rezultatul unei încrucișări între indivizii II-4 și II-5.

Trăsăturile moștenite extracromozomial sunt răspândite la artropode. La buburuza *Adalia bipunctata a fost descoperită o trăsătură masculin* - letală, astfel încât anumite tulpini de femele prezintă un raport sexual distorsionat , favorizând urmașii de sex feminin (Werren, J., et al. 1994. *Bacterial.* 176:388-394). Tulpinile neafectate prezintă un raport sexual normal de 1:1. Două observații importante sunt că tulpinile afectate pot fi vindecate cu antibiotice și că, pe lângă ARNr-ul lor normal 18S și 28S , Un ARNr 16S poate fi detectat prin PCR (reacție în lanț a polimerazei) . Dintre tipurile de moștenire extranucleară descrise în text (moștenire prin organele , moștenire infecțioasă și efect matern), care este cel mai probabil să ducă la modificarea raportului de sexe la *Adalia?*

17. Cercetătorii au examinat o familie cu o distribuție interesantă a simptomelor sindromului Leigh. În acest sindrom, indivizii pot prezenta pierderea progresivă a funcției motorii (ataxie, A) cu neuropatie periferică (PN, care este o inadaptare a nervilor periferici). O mutație a ADN-ului mitocondrial (ADNmt) care reduce activitatea ATP-azei a fost identificată în mai multe țesuturi ale indivizilor afectați . Tabelul următor rezumă prezența simptomelor într-o familie extinsă.

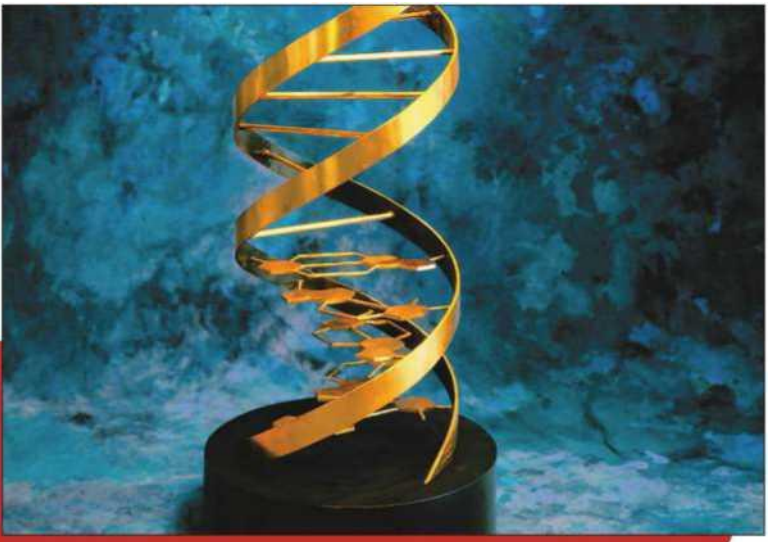
18.

Persoană	Stare	Procentul de mitocondrii cu mutația
Testare	AyPN	>90%
Frate	Ay PN	>90%
Frate	Asimptomatic	17%
Mamă	PN	86%
Unchiul matern	PN	85%
Văr pe linie maternă	AyPN	90%
Văr pe linie maternă	AyPN	91%
Bunica maternă	Asimptomatic	56%

(a) Elaborați o genealogie care să sintetizeze informațiile prezentate în tabel.
(b) Oferiți o explicație pentru modelul de moștenire al acestei tulburări. Ce termen descrie acest model?
(c) Cum pot indivizii din aceeași familie să prezinte o astfel de variație a simptomelor? Ce termen legat de moștenirea organelelor descrie o astfel de variație?
(d) Cum diferă o afecțiune cauzată de ADNmt în expresia și transmiterea sa de o mutație care provoacă albinism ?

19. Mutațiile din ADN-ul mitocondrial par a fi responsabile pentru diverse tulburări neurologice, inclusiv sindromul de epilepsie miodonică ragged-red, neuropatia optică ereditară Leber și sindromul Kearns -Sayre . În fiecare caz, fenotipul tulburării este exprimat atunci când raportul dintre mitocondriile mutante și cele de tip sălbatic depășește un anumit prag caracteristic fiecărei tulburări, dar se găsește de obicei în intervalul 60-95 %.
(a) Având în vedere că acestea sunt boli grave, de ce nu a fost dezvoltat niciun leac? Ați putea sugera o abordare generală care ar putea fi utilizată pentru a trata sau chiar vindeca aceste tulburări?
(b) Comparativ cu numărul vast de mitocondrii dintr-un embrion, numărul de mitocondrii dintr-un ou este relativ mic . Ar putea această blocare mitocondrială din ovoplasmă să reprezinte o oportunitate de a găsi o terapie sau un leac? Explicați răspunsul.

10



Structura și analiza ADN-ului

CONCEPTE CAPITOL

►► Cu excepția unor virusuri, ADN-ul este materialul genetic al tuturor ființelor vii de pe Pământ.

►► Conform modelului Watson și Crick, ADN-ul se prezintă sub forma unei duble spirale încolăcite spre dreapta.

►► Lanțurile cu dublă spirală sunt antiparalele și sunt ținute împreună prin legături de hidrogen între perechi de baze azotate complementare.

►► Structura ADN-ului oferă mijloacele de stocare și exprimare a

informațiilor genetice.

►► ARN-ul are multe asemănări cu ADN-ul , dar cel mai adesea apare sub forma unei molecule monocatenare .

►► La unele virusuri, ARN-ul este utilizat ca material genetic .

►► Au fost dezvoltate numeroase tehnici care facilitează analiza acizilor nucleici, majoritatea bazându-se pe detectarea complementarității bazelor azotate .

YO Până în acest moment, în Cartea I am descris cromozomii ca recipiente de gene - gene care controlează trăsăturile fenotipice transmise viitorilor urmași prin intermediul gameților. Logic, genele trebuie să conțină un anumit tip de informație care, odată transmisă unei noi generații, influențează forma și caracteristicile fiecărui individ. Această informație se numește material genetic. Am putea concluziona, de asemenea, că aceeași informație trebuie să dirijeze cumva procesele complexe care duc un organism la forma sa adultă.

Până în 1944, nu era clar care componentă chimică a cromozomilor forma genele și constituia materialul genetic . Întrucât se știa că cromozomii sunt compuși din acid nucleic și proteine, ambele componente erau considerate candidate. Cu toate acestea, în 1944, au apărut dovezi experimentale directe că ADN-ul acidului nucleic servea drept bază informațională în procesul de moștenire.

Odată ce importanța ADN-ului în procesele genetice a fost recunoscută, cercetările s-au intensificat în speranța de a determina nu doar structura acestei molecule, ci și relația dintre structura și funcția sa. Între 1944 și 1953, mulți oameni de știință au căutat informații care ar putea răspunde la cea mai intrigantă întrebare din istoria biologiei: cum poate ADN-ul să servească drept bază genetică pentru procesele vieții? Cercetătorii credeau că răspunsul trebuie să depindă în mare măsură de structura chimică a moleculei de ADN, având în vedere funcțiile complexe, dar ordonate, care îi sunt atribuite.

Aceste eforturi au fost răsplătite în 1953, când James Watson și Francis Crick au propus ipoteza lor privind natura de dublă spirală a ADN-ului. Presupunerea că funcțiile moleculei ar fi mai ușor de clarificat după determinarea structurii sale generale s-a dovedit corectă . În acest capitol, vom analiza mai întâi dovezile că ADN-ul este materialul genetic și apoi vom discuta structura sa. Vom încheia capitolul cu o prezentare generală a diferitelor tehnici analitice utile pentru investigarea acizilor nucleici, ADN-ului și ARN-ului.

10.1 Materialul genetic trebuie să prezinte patru caracteristici

Pentru ca o moleculă să servească drept material genetic, aceasta trebuie să posede patru caracteristici principale: replicarea, stocarea informațiilor, exprimarea informațiilor și variația prin mutație. Replicarea materialului genetic este o fațetă a ciclului celular, o proprietate fundamentală a tuturor organismelor vii. Odată ce materialul genetic din celule s-a replicat și s-a dublat în cantitate, acesta trebuie împărțit în mod egal (prin *mitoză*) între celulele fiice. Materialul genetic este, de asemenea , replicat în timpul formării gameților, dar este divizat astfel încât fiecare celulă primește doar jumătate din cantitatea inițială de material genetic - procesul meiozei discutat în Capitolul 2. *Deși* produsele mitozei și meiozei sunt diferiți , ambele procese fac parte din fenomenul mai general al reproducerii celulare.

Stocarea *informațiilor* Acest lucru necesită ca molecula să acționeze ca un depozitar de informații genetice care pot fi sau nu exprimate de celula în care se află. Este clar că, deși majoritatea celulelor conțin o copie completă a genomului organismului, la un moment dat ele exprimă doar o parte din potențialul lor genetic . De exemplu, bacteriile „activează" multe gene ca răspuns la anumite condiții de mediu și le dezactivează atunci când aceste condiții se schimbă. La vertebrate , celulele epiteliale pot avea genele melaninei active , dar nu activează niciodată genele hemoglobinei ; prin contrast, celulele digestive activează multe gene specifice - funcției lor , dar nu activează genele melaninei.

Inerentă conceptului de stocare este necesitatea ca materialul genetic să fie capabil să codifice varietatea aproape infinită de produse genetice găsite în nenumăratele forme de viață prezente pe planeta noastră . Limbajul chimic al materialului genetic trebuie să aibă capacitatea de a stoca aceste informații diverse și de a le transmite celulelor și organismelor descendente.

Expresia Prelucrarea informațiilor genetice stocate este un proces complex și stă la baza conceptului de flux informațional în interiorul celulei (Figura 10.1). Evenimentul inițial în acest flux informațional este transcripția ADN-ului, care are ca rezultat sinteza a trei tipuri de molecule de ARN: ARN mesager (ARNm), ARN de transfer (ARNt) și ARN ribozomal (ARNr) . Dintre acestea , ARNm - urile sunt traduse în proteine printr - un proces mediat de ARNt și ARNr . Fiecare ARNm este produsul unei gene specifice și direcționează sinteza unei proteine diferite. În traducere , informația chimică din ARNm direcționează construirea unui lanț de aminoacizi , numit polipeptidă, care apoi se pliază pentru a forma o proteină. Colectiv, aceste procese stau la baza dogmei centrale a geneticii moleculare: „ADN-ul produce ARN , iar ARN-ul produce proteine".

Materialul genetic este, *de asemenea, sursa variabilității* între organisme , prin procesul de mutație . Dacă apare o mutație - o modificare a compoziției chimice a ADN-ului - modificarea se va reflecta în timpul transcripției și traducerii, afectând proteina specificată . Dacă o mutație este prezentă într- un gamet, aceasta poate fi transmisă generațiilor viitoare și , în timp, se poate răspândi în întreaga populație . Variația genetică , care include și modificări .

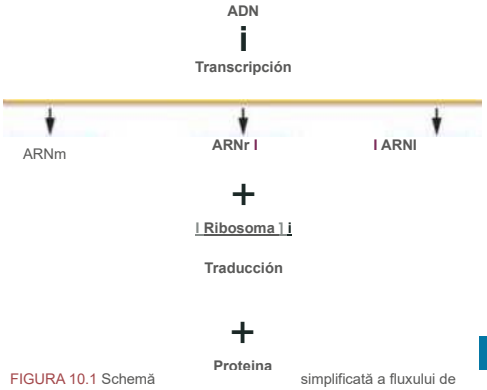


FIGURA 10.1 Schemă simplificată a fluxului de informații (dogma centrală) de la ADN la ARN pentru a produce proteine în interiorul celulelor.

în numărul de cromozomi și rearanjările din interiorul și între cromozomi (așa cum am văzut în Capitolul 8), oferă materia primă pentru procesul evoluției.

10.2

Până în 1944, observațiile au favorizat proteinele ca material genetic.

Ideea că materialul genetic se transmite fizic de la părinți la urmași a fost acceptată încă de la începuturile conceptului de ereditate. Până la sfârșitul secolului al XIX-lea, cercetările privind structura biomoleculelor progresaseră considerabil, punând bazele descrierii materialului genetic în termeni chimici. Deși atât proteinele, cât și acizii nucleici erau considerați cei mai buni candidați pentru a servi drept material genetic, până în anii 1940 mulți geneticieni au favorizat proteinele. Acest lucru nu este surprinzător, deoarece se știa că proteinele sunt atât diverse, cât și abundente în celule și se știau mult mai multe despre chimia proteinelor decât despre chimia acizilor nucleici .

Chimistul elvețian Friedrich Miescher a fost primul care a studiat ADN-ul în 1869. El a izolat nucleele celulare și a obținut o substanță acidă, despre care se știe acum că conține ADN; a numit această substanță nucleină. Cu toate acestea, pe măsură ce cercetările asupra ADN-ului au progresat, demonstrând prezența sa în cromozomi , această substanță părea să nu aibă diversitatea chimică necesară pentru a stoca informații genetice complete.

Această concluzie se bazează în principal pe observațiile făcute de Phoebus A. Levene în 1910, conform cărora ADN-ul conținea cantități aproximativ egale din patru molecule similare numite nucleotide . Levene a postulat în mod eronat că grupuri identice ale acestor patru componente erau repetate iar și iar, ceea ce a format baza ipotezei sale tetranucleotidice pentru structura ADN -ului. Drept urmare, atenția acordată ADN-ului a scăzut în dizgrație, iar proteinele au primit un tratament preferențial. Cu toate acestea, în anii 1940, Erwin Chargaff a arătat că propunerea lui Levene era incorectă , demonstrând că majoritatea organismelor nu conțin proporții exact egale din cele patru nucleotide . Vom vedea mai târziu că structura ADN - ului susține observațiile lui Chargaff.

10.3

Dovezile în favoarea ADN-ului ca material genetic au fost obținute inițial prin studiul bacteriilor și bacteriofagilor.

Primul eveniment care a dus la acceptarea ADN-ului ca material genetic a fost publicația din 1944 a lui Oswald Avery, Colin MacLeod și Maclyn McCarty despre natura chimică a unui „principiu transformator" la bacterii. Această lucrare , împreună cu descoperirile ulterioare ale altor echipe de cercetare , a constituit prima dovadă experimentală directă că ADN- ul , și nu proteinele , este biomolecula responsabilă de ereditate. Această descoperire a marcat începutul erei geneticii *moleculare* , o perioadă de descoperiri în biologie care a stat la baza studiilor actuale în biotehnologie și ne-a adus mai aproape de înțelegerea bazelor evoluției. Impactul acestor descoperiri inițiale asupra cercetărilor și gândirii viitoare este paralel cu munca care a urmat publicării teoriei evoluției a lui Darwin și redescoperirii ulterioare a postulatelor lui Mendel asupra geneticii transmiterii . Împreună, aceste evenimente constituie cele trei mari revoluții în biologie.

Transformare: studiile inițiale

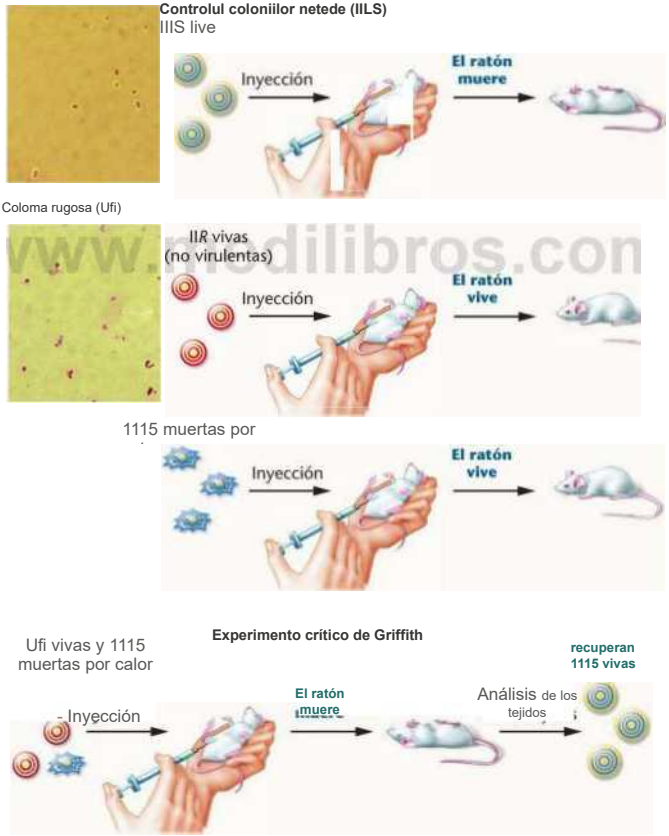
Cercetările care au stat la baza lucrărilor lui Avery, MacLeod și McCarty au fost inițiate în 1927 de Frederick Griffith, un ofițer medical din cadrul Ministerului Sănătății britanic. El a efectuat experimente cu mai multe tulpini diferite ale bacteriei *Diplococcus pneumoniae**. Unele tulpini erau *virulente,* Adică, tulpini

infecțioase care provoacă pneumonie la unele vertebrate (în principal oameni și șoareci), în timp ce altele erau *avirulente* sau neinfecțioase, adică nu provoacă boli.

Diferența de virulență este determinată de prezența unei capsule polizaharidice; tulpinile virulente posedă această capsulă, în timp ce tulpinile non-virulente nu. Bacteriile fără capsulă sunt ușor fagocitate și distruse de celulele fagocitare din sistemul circulator al animalului. Bacteriile virulente, care posedă o capsulă polizaharidă, sunt dificil de fagocitat; se înmulțesc și provoacă pneumonie.

Prezența sau absența unei capsule este, de asemenea, baza unei alte diferențe caracteristice între tulpinile virulente și cele nevirulente. Bacteriile încapsulate formează colonii cu o suprafață lucioasă și netedă (S) atunci când sunt cultivate pe plăci de agar; tulpinile necapsulate produc colonii rugoase (K) (Figura 10.2). Această caracteristică permite o diferențiere ușoară între tulpinile virulente și cele nevirulente folosind tehnici standard de cultură microbiologică.

Fiecare tulpină de *Diplococcus* poate aparține unuia dintre zecile de tipuri diferite numite *serotipuri,* care diferă prin structura chimică fină a poliascarilor care formează capsula groasă și lipicioasă. Serotipurile sunt



(virulent)

Acestea sunt identificate folosind tehnici imunologice și sunt, în general, denumite folosind cifre romane. În Statele Unite, tipurile I și II sunt cea mai frecventă cauză de pneumonie . În experimentele esențiale care au condus la noi concepte despre materialul genetic, Griffith a utilizat tipurile IIR și IIIS. Tabelul 10.1 rezumă caracteristicile celor două tulpini Griffith.

TABELUL 10.1 Tulpinile *de Diplococcus pneumoniae* utilizate de Frederick Griffith în experimentele sale originale de transformare

	Morfologia coloniei		
Serotip		**Capsulă**	**Virulență**
IIR	Stare brută	Absent	Nu este virulent
1115	Lisa	Prezent	Virulent

Griffith știa din munca altor cercetători că doar celulele virulente vii produceau pneumonie la șoareci . Bacteriile virulente ucise termic, injectate în șoareci, nu provocau pneumonie, la fel cum nici bacteriile vii non-virulente nu. În experimentul său critic (Figura 10.2), Griffith a injectat șoareci cu celule IIR (non-virulente) vii, împreună cu celule IIIS (virulente) ucise termic. Întrucât niciun tip de celulă nu a cauzat moartea șoarecilor atunci când a fost injectat separat, Griffith se aștepta ca dubla injecție să fie, de asemenea, fatală. Dar, după cinci zile, toți șoarecii care primiseră dubla injecție erau morți. Paradoxal, testele de sânge ale șoarecilor morți au relevat cantități mari de bacterii vii de tip IIIS (virulente).

Din câte s-a putut determina, aceste bacterii IIIS erau identice cu tulpina IIIS din care fusese obținută prepararea celulelor ucise termic. Șoarecii de control , cărora li s- au injectat bacterii IIR non-virulente pentru acest experiment, nu au dezvoltat pneumonie și au rămas sănătoși. Acest lucru a exclus posibilitatea ca celulele IIR non-virulente să se fi transformat (sau să fi suferit mutații) pur și simplu în celule IIIS virulente în absența bacteriilor IIIS ucise termic . Dimpotrivă, era necesar un anumit tip de interacțiune între celulele IIR vii și celulele IIIS ucise termic .

Griffith a concluzionat că bacteriile IIIS distruse de căldură erau cumva responsabile de transformarea celulelor IIR non-virulente în celule IIIS virulente. El a numit acest fenomen transformare și a sugerat că *principiul transformator* ar putea fi o parte a capsulei de polizaharidă sau un compus necesar pentru sinteza capsulei, chiar dacă capsula singură nu provoca pneumonie. În cuvintele lui Griffith, principiul transformator al celulelor IIIS moarte servea drept „pabulum" (adică nutrient) pentru celulele IIR.

Munca lui Griffith i-a determinat pe alți medici și bacteriologi să investigheze fenomenul transformării . În 1931, Henry Dawson de la Institutul Rockefeller a confirmat observațiile lui Griffith și a dus munca sa cu un pas mai departe. Dawson și colaboratorii săi au demonstrat că transformarea poate avea loc *in vitro* (într -o eprubetă) . Dacă celulele IIIS distruse termic au fost incubate cu celule IIR vii , s-au recuperat celule IIIS vii. Prin urmare, nu este necesară injectarea șoarecilor pentru ca transformarea să aibă loc . În 1933, J. Lionel Alloway a rafinat experimentele *in vitro* . folosind extracte brute de celule IIIS și IIR vii . Filtratul solubil obținut din celulele IIIS ucise termic a fost la fel de eficient în inducerea transformării ca și celulele intacte . Alloway și alții nu au asociat transformarea cu un proces genetic , ci mai degrabă cu un fel de modificare fiziologică. Cu toate acestea , dovezile experimentale că o substanță chimică a fost responsabilă pentru transformare au fost destul de - convingătoare.

Transformarea: Experimentul Avery, MacLeod și McCarty

Desigur, cea mai importantă întrebare era care moleculă servea drept principiu transformator. În 1944, după 10 ani de muncă, Avery, MacLeod și McCarty și-au publicat rezultatele , care sunt considerate acum un articol clasic în domeniul geneticii moleculare . În acest articol , ei au raportat că au obținut principiul - transformator în forma sa pură și că, dincolo de orice îndoială rezonabilă , era vorba de ADN .

Figura 10.3 prezintă o schemă a detaliilor acestei lucrări, adesea denumită experimentul Avery, MacLeod și McCarty. Acești cercetători au început procesul de izolare cu cantități mari de culturi lichide (50 până la 75 de litri) de celule virulente de tip HIS . Celulele au fost centrifugate, colectate și eliminate termic. După omogenizare și extracții multiple cu un detergent numit deoxicolat (DOC), cercetătorii au obținut un filtrat solubil care și - a păstrat capacitatea de a induce transformarea celulelor de tip IIR non-virulente . Proteinele au fost îndepărtate din filtratul activ prin mai multe extracții cu cloroform, iar polizaharidele au fost digerate enzimatic și îndepărtate. În final, precipitarea cu etanol a produs o masă fibroasă care și - a păstrat capacitatea de a induce transformarea celulelor de tip IIR non-virulente . Din cei 75 de litri inițiali de probă, această procedură a produs între 10 și 25 mg din acest „ factor activ".

Noi teste au stabilit clar că ADN-ul era principiul transformator. Inițial, a fost analizat raportul azot/fosfor din masa fibroasă .

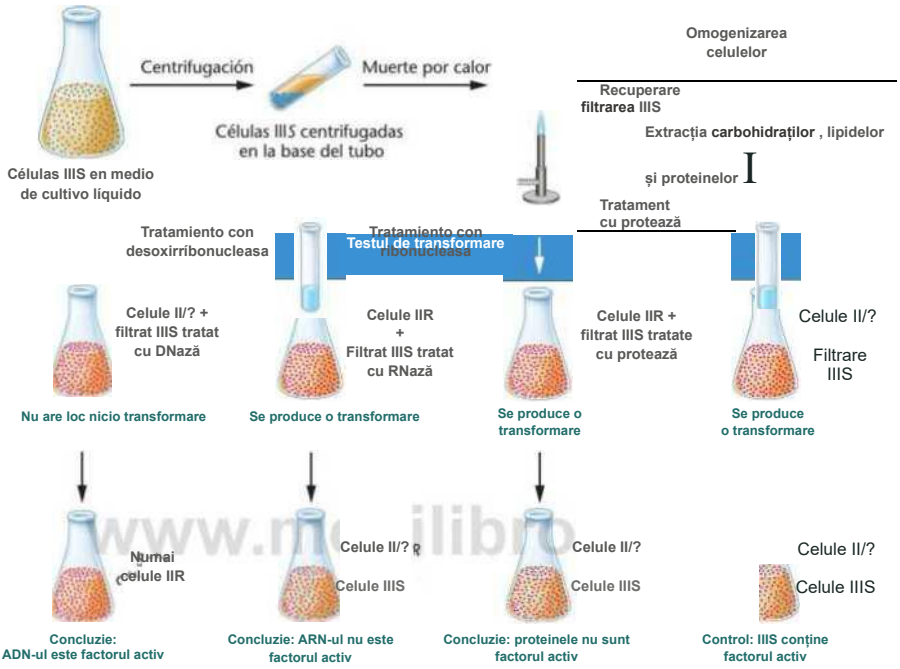

Centrifugación
Muerte por calor
Células IIIS centrifugadas en la base del tubo
Células IIIS en medio de cultivo líquido
Omogenizarea celulelor
Recuperare filtrarea IIIS
Extracția carbohidraților , lipidelor și proteinelor I
Tratament cu protează
Tratamiento con desoxirribonucleasa
Tratamiento con ribonucleasa
Testul de transformare
Celule II/? + filtrat IIIS tratat cu DNază
Celule IIR + Filtrat IIIS tratat cu RNază
Celule IIR + filtrat IIIS tratate cu protează
Celule II/? Filtrare IIIS
Nu are loc nicio transformare
Se produce o transformare
Se produce o transformare
Se produce o transformare
Numai celule IIR
Celule II/? R
Celule IIIS
Celule II/?
Celule IIIS
Celule II/?
Celule IIIS
Concluzie: ADN-ul este factorul activ
Concluzie: ARN-ul nu este factorul activ
Concluzie: proteinele nu sunt factorul activ
Control: IIIS conține factorul activ
Celule SS3 IIIS
S'3 IIR

FIGURA 10.3 Rezumatul experimentului Avery, MacLeod și McCarthy care demonstrează că ADN-ul este principiul transformator.

Aceasta a coincis cu denumirea de „dezoxiribonucleat de sodiu", denumirea chimică folosită atunci pentru a descrie ADN-ul. Pentru a-și consolida descoperirile , Avery, MacLeod și McCarty au încercat să elimine cât mai mulți contaminanți posibil din produsul final. Pentru a realiza acest lucru, l-au tratat cu enzimele proteolitice tripsină și chimotripsină și, ulterior, cu o enzimă care digeră ARN-ul, numită ribonuclează (RNază). Aceste tratamente au distrus orice proteină și ARN rămas. Cu toate acestea, activitatea de transformare a rămas. Testele chimice ale produsului final au dat reacții pozitive puternice pentru ADN. Confirmarea finală a venit din experimente folosind probe brute de dezoxiribonuclează (DNază), o enzimă care digeră ADN-ul, izolată din serul de câine și iepure. Digestia cu această enzimă a distrus activitatea de transformare a filtratului - așa că Avery și colaboratorii săi erau siguri că principiul activ de transformare în aceste experimente era ADN-ul.

Volumul imens de muncă, verificările și reverificările repetate ale concluziilor și logica fără echivoc a designului experimental în cercetarea acestor trei oameni de știință sunt cu adevărat impresionante. Cu toate acestea, concluziile lui Avery, MacLeod și McCarty din publicația lor din 1944 au fost enunțate într-un mod foarte simplu: „ Dovezile prezentate susțin faptul că un acid nucleic de tip dezoxiriboză ***este unitatea fundamentală a principiului -

***Deoxiriboza se numește acum dezoxiriboză.

transformator al *Pneumococului* de tip III.”

Avery și colegii săi au recunoscut implicațiile genetice și biochimice ale muncii lor. Ei au observat că „acizii nucleici de acest tip ar trebui considerați nu doar importanți din punct de vedere structural, ci și funcțional, deoarece determină activitățile biochimice și caracteristicile specifice ale celulelor pneumococice". Acest lucru a sugerat că principiul transformator a interacționat cu celulele de tip IIR, ducând la o serie de reacții enzimatice coordonate care au culminat cu sinteza capsulei polizaharidice de tip IIIS. Acești oameni de știință au subliniat că, odată ce are loc transformarea , generațiile succesive produc și capsula polizaharidă. Prin urmare, transformarea este ereditară, iar procesul afectează materialul genetic.

Imediat după publicarea acestui raport , mai mulți cercetători și-au îndreptat sau intensificat eforturile de cercetare asupra transformării pentru a încerca să clarifice rolul ADN-ului în mecanismele genetice . În special, munca lui Rollin Hotchkiss a ajutat la confirmarea faptului că ADN-ul, nu proteinele, este factorul esențial în transformare. În 1949, într-un studiu separat, Harriet Taylor a izolat o tulpină mutantă extrem de rugoasă (ER) dintr -o tulpină rugoasă (R). Tulpina ER a produs colonii mai neregulate decât cele ale tulpinii R. ADN-ul din tulpina R a efectuat transformarea tulpinii ER în tulpina R. În acest fel, tulpina R, care a fost recipientul în experimentele lui Avery, a demonstrat că era capabilă să fie și un donator de ADN în transformări.

Transformarea a fost demonstrată la *Haemophilus influenzae, Bacillus subtilis, Shigella paradysenteriae* și *Escherichia coli,* printre multe alte microorganisme. De asemenea, a fost demonstrată transformarea numeroaselor trăsături genetice, altele decât morfologia coloniilor, cum ar fi rezistența la antibiotice . Aceste observații au întărit convingerea că transformarea ADN-ului este în primul rând un fenomen genetic, mai degrabă decât o simplă schimbare fiziologică. Această idee va fi discutată din nou la sfârșitul acestui capitol, în secțiunea „Idei și soluții ".

Experimentul Hershey-Chase

doilea set de dovezi care susțin ADN- ul ca material genetic a fost furnizat de studiul infecției bacteriei *Escherichia coli* de către unul dintre virusurile care o utilizează ca gazdă, bacteriofagul T2. Adesea numit simplu fag, acest virus constă dintr-un înveliș proteic care înconjoară un nucleu de ADN. Micrografiile electronice au relevat că structura externă a fagului constă dintr-un cap hexagonal și o coadă. Figura 10.4 prezintă aspectele generale ale ciclului de viață al unui bacteriofag cu pereche T , cum ar fi T2, așa cum erau cunoscuți în 1952. Pe scurt, fagul intră în contact cu celula bacteriană și introduce unele dintre componentele acesteia . După infecție , informația virală „recrutează" aparatura celulei gazdă pentru a efectua replicarea virală. Într -un timp rezonabil de scurt , mulți fagi noi sunt asamblați , celula bacteriană se lizează , iar urmașii virali sunt eliberați . Acest proces se numește ciclul utic .

În 1952, Alfred Hershey și Martha Chase au publicat rezultatele experimentelor menite să clarifice evenimentele care duc la reproducerea fagilor . Mai multe dintre experimente au stabilit clar funcțiile independente ale proteinei fagice și ale acidului nucleic în timpul procesului de replicare asociat celulelor bacteriene . Hershey și Chase știau , pe baza datelor existente, că :

1. Fagii T2 erau alcătuiți din aproximativ 50 % proteine și 50 % ADN .
2. Infecția a început odată cu adsorbția fagului la nivelul celula bacteriană, datorită fibrelor din coada sa .
3. Producerea de noi virusuri a avut loc în interiorul celulei bacteriene .

Se părea că o componentă moleculară a fagului - ADN -ul sau proteina (sau ambele) - a intrat în celula bacteriană și a direcționat replicarea virală . Care dintre ele era aceea?

Hershey și Chase au folosit radioizotopii ^{2}P și ^{35}S pentru a urmări componentele moleculare ale fagilor în timpul infecției . Deoarece ADN-ul conține fosfor (P) , dar nu sulf, ^{34}P marchează eficient ADN-ul ; deoarece proteinele conțin sulf (S) , dar nu fosfor, ^{35}S marchează proteina . Acesta *a fost punctul cheie* al experimentului . Dacă celulele de E. *coli sunt cultivate* În prezența * ^{2P} sau ^{35S} și ulterior infectați cu virusul T2 , descendenții fagilor vor avea un nucleu de ADN marcat radioactiv sau, respectiv , un înveliș proteic . Fagii marcați pot fi izolați și utilizați pentru a infecta bacterii nemarcate (Figura 10.5).

Când fagii marcați și bacteriile nemarcate sunt amestecate , fagii își leagă fibrele cozii de peretele celular bacterian , formând un complex de adsorbție. Aceste complexe au fost izolate și agitate viguros într-un blender . Forța de agitare a separat fagii care erau legați de peretele celular bacterian , permițând analizarea separată a fagilor și bacteriilor . După centrifugare , particulele de fag , fiind mai ușoare decât bacteriile , s-au separat de celulele bacteriene (Figura 10.5). Hershey și Chase au reușit să demonstreze, după detectarea radioizotopilor , că cea mai mare parte a ADN -ului marcat cu ^{32P}

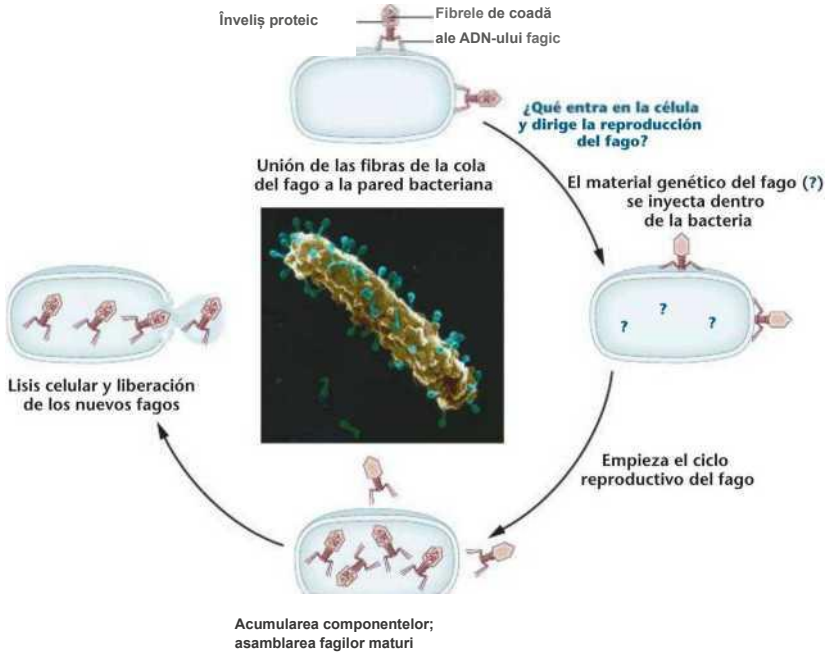


FIGURA 10.4 Ciclul de viață al unui bacteriofag cu perechi T, așa cum era cunoscut în 1952. Micrografia electronică prezintă o bacterie *E. coli* infectată de numeroși fagi.

ADN-ul viral fusese transferat în celulele bacteriene după adsorbție; cu toate acestea, după amestecare , aproape toate proteinele marcate cu ^{32S} au rămas în afara celulei bacteriene și au putut fi recuperate în învelișurile goale ale fagilor („fantome ”). După această separare, celulele bacteriene, care conțineau acum ADN-ul viral, s-au lizat pe măsură ce erau produși noii fagi. Fagii urmași conțineau ^{32P} , dar nu și ^{35S} .

Hersey și Chase au interpretat aceste rezultate ca indicând faptul că proteina de înveliș a fagului rămâne în afara celulei gazdă și nu este implicată în direcționarea producției de noi fagi. Pe de altă parte, și mai important, ADN-ul fagului intră în celula gazdă și îi direcționează replicarea. Ei au demonstrat că, în fagul T2, materialul genetic este ADN, nu proteină.

Aceste experimente, împreună cu cele ale lui Avery și ale -colaboratorilor săi, au furnizat dovezi convingătoare că ADN-ul era molecula responsabilă de ereditate. Această concluzie a servit de atunci drept piatră de temelie a domeniului geneticii moleculare.

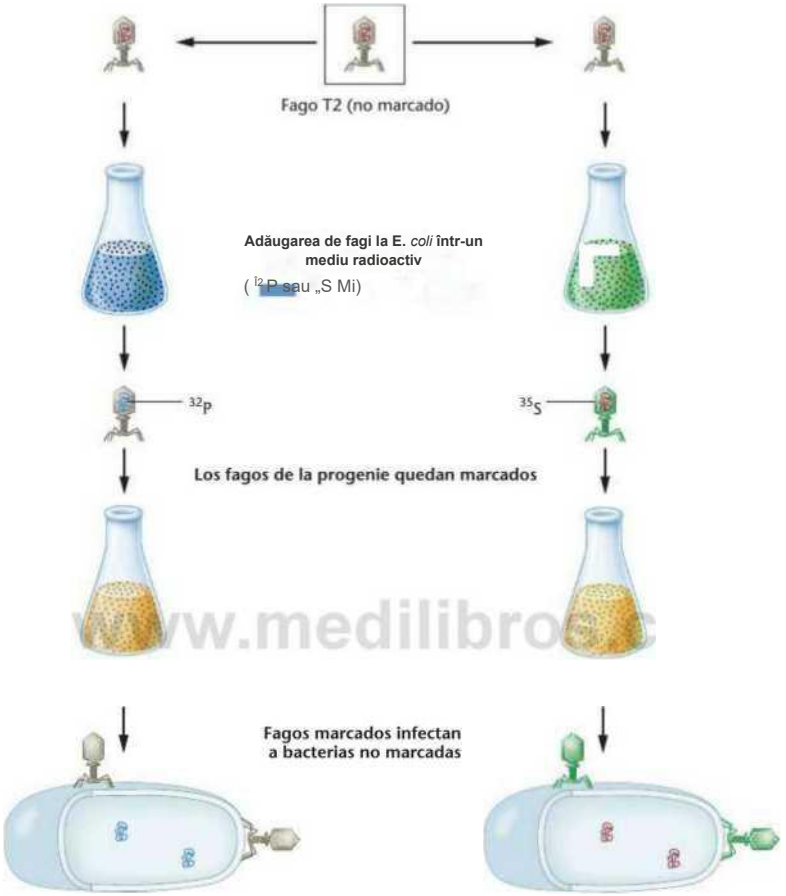
ACUM REZOLVĂ ASTA

10.1 Ar putea funcționa un experiment similar cu cel realizat de Hershey și Chase dacă s-ar aplica designul de bază fenomenului de transformare? Explicați de ce și de ce nu.

- SUGESTIE: Această problemă necesită înțelegerea *protocolului experimentului Hershey -Chase aplicat cercetării transformării. Cheia rezolvării acesteia este să ne amintim că, în transformare, ADN-ul exogen intră în celula care urmează să fie transformată, fără ca procesul să implice niciun contact intercelulă* .

Experimente de transfecție

În cei opt ani care au urmat publicării experimentului Hershey - Chase , cercetările ulterioare efectuate cu virusuri bacteriene au furnizat dovezi și mai puternice că ADN-ul este materialul genetic . În 1957 , mai multe publicații au demonstrat că tratarea *E. coli* cu enzima lizozim ar putea îndepărta peretele exterior al celulei fără a distruge bacteria . În termeni mai simpli...


Fago T2 (no marcado)
Adăugarea de fagi la E. coli într-un mediu radioactiv
(32P sau „S Mi)
32P
35S
Los fagos de la progenie quedan marcados
Fagos marcados infectan a bacterias no marcadas

www.medilibros

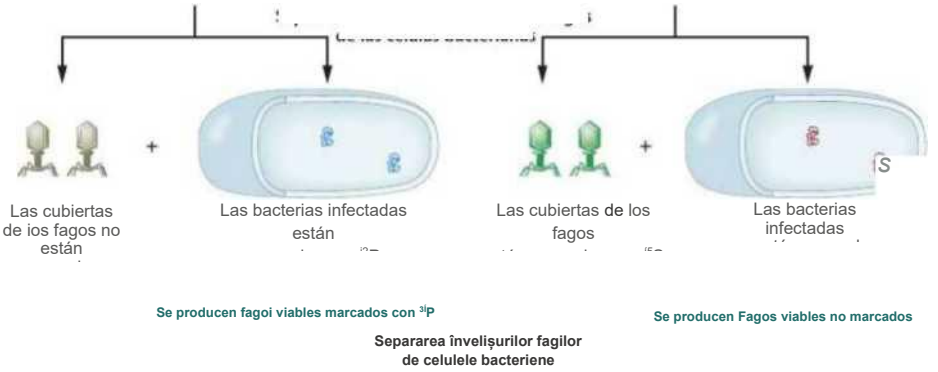

Las cubiertas de ios fagos no están
Las bacterias infectadas están
Las cubiertas de los fagos
Las bacterias infectadas
Se producen fagoi viables marcados con 31P
Se producen Fagos viables no marcados
Separarea învelişurilor fagilor de celulele bacteriene

FIGURA 1 0.5 Rezumatul experimentului Hershey-Chase, care arată că ADN-ul, ***şi*** nu proteinele, este responsabil pentru dirijarea reproducerii fagului T2 în timpul ***infecţiei cu E. coli.***

Celulele tratate enzimatic sunt goale, membrana celulară fiind stratul lor cel mai exterior. Aceste structuri se numesc protoplaste (sau sferoplaste). John Spizizen și Dean Fraser au publicat independent că protoplastele ar putea fi utilizate pentru a iniția replicarea fagilor cu particule T2 rupte. Adică, dacă s-ar folosi protoplaste, virusul nu ar trebui să fie intact pentru ca infecția să aibă loc . Astfel, învelișul proteic poate fi esențial pentru trecerea ADN-ului prin peretele celular intact, dar dacă se folosesc protoplaste, acest înveliș nu este esențial pentru infecție.

În 1960, George Guthrie și Robert Sinsheimer au publicat un experiment similar, deși mai elaborat. Ei au purificat ADN din bacteriofagul d>X 174, un fag mic care conține o moleculă de ADN circulară monocatenară de aproximativ 5.386 de nucleotide . Când a fost adăugat la *protoplaste de E. coli,* ADN-ul purificat a dus la producerea de bacteriofagi d>X 174 complet formați. Acest proces de infecție, numit transfecție, prin intermediul acidului nucleic viral izolat, a demonstrat în mod concludent că ADN-ul d>X174 conține toate informațiile necesare pentru a produce virusuri mature. Acest lucru a întărit dovezile care susțin concluzia că ADN-ul servește drept material genetic, deși toate dovezile directe până în acel moment fuseseră obținute din studii pe bacterii și virusuri.

Dovezile indirecte și directe susțin conceptul că ADN-ul este materialul genetic la eucariote

În 1950, organismele eucariote nu erau potrivite pentru tipul de experimente care foloseau bacterii și virusuri pentru a demonstra că ADN-ul este materialul genetic. Cu toate acestea, se presupunea în general că materialul genetic trebuie să fie o substanță universală, care ar îndeplini această funcție și la eucariote. Această presupunere s-a bazat inițial pe diverse observații circumstanțiale (indirecte) care, luate împreună, au susținut ideea că ADN-ul servește drept material genetic la eucariote. Ulterior, dovezile directe au stabilit fără echivoc rolul central al ADN-ului în procesele genetice.

Dovezi indirecte: distribuția ADN-ului

Materialul genetic ar trebui să se găsească acolo unde își îndeplinește funcția - în nucleu, ca parte a cromozomilor . Atât ADN-ul, cât și proteinele îndeplinesc acest criteriu. Cu toate acestea, proteinele sunt și ele din abundență.

Conținutul de ADN al celulelor haploide și diploide din diferite specii*

Organism	*n* (pg)	2*n* (pg)
Uman	3,25	7.30
Pui	1,26	2,49
Păstrăv	2,67	5,79
Cort mare	1,65	3.49
Aloșie	0,91	1,97

Spermatozoizii (n) și precursorii nucleați ai globulelor roșii (2rt) au fost utilizați pentru a compara nivelurile de ploidie.

10.4 în citoplasmă, în timp ce ADN-ul nu este. Se știe că atât mitocondriile, cât și cloroplastele îndeplinesc funcții genetice și că ADN-ul este prezent și în aceste organite. Astfel, ADN-ul se găsește doar acolo unde au loc funcțiile genetice primare . Pe de altă parte, proteinele se găsesc în toată celula . Toate aceste observații sunt în concordanță cu interpretarea care favorizează ADN-ul, și nu proteinele, ca material genetic.

Întrucât se stabilise deja că cromozomii prezenți în nucleu conțineau materialul genetic, era de așteptat să existe o corelație între ploidia (n, 2n etc.) unei celule și cantitatea substanței care servește drept material genetic. Se pot face comparații semnificative între gameți (spermatozoizi și ovule) și celulele somatice sau ale corpului . Acestea din urmă sunt diploide *(2n)* . și au de două ori mai mulți cromozomi decât gameți , care sunt haploizi (n).

Tabelul 10.2 compară, pentru diferite organisme, cantitatea de ADN găsită în spermatozoizii haploizi cu cantitatea prezentă în precursorii nucleați diploizi ai globulelor roșii. Există o corelație puternică între cantitatea de ADN și numărul de seturi de cromozomi . În schimb, această corelație între gameți și celulele diploide nu este observată la nivel proteic. Aceste date oferă dovezi suplimentare circumstanțiale care favorizează ADN-ul în detrimentul proteinelor ca material genetic al eucariotelor.

Dovezi indirecte: mutageneză

TABLA 10.2

Lumina ultravioletă (UV) este unul dintre numeroșii agenți capabili să inducă mutații în materialul genetic. Organismele simple , cum ar fi drojdia și alte ciuperci, pot fi iradiate cu diferite lungimi de undă ale luminii ultraviolete , iar eficacitatea fiecărei lungimi de undă poate fi măsurată în funcție de numărul de mutații pe care le induce. Reprezentarea grafică a acestor date produce spectrul de acțiune al luminii UV ca agent mutagen. Acest spectru de acțiune poate fi comparat cu spectrul de absorbție al oricărei molecule suspectate a fi material genetic (Figura 10.6).

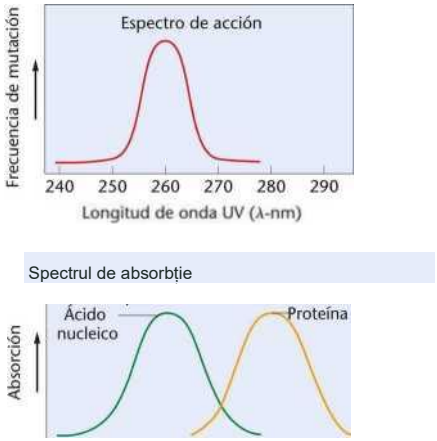


FIGURA 10.6 Comparație între spectrul de acțiune (care determină lungimea de undă UV mutagenă cea mai eficientă) și spectrul de absorbție (care arată intervalul de lungimi de undă la care acizii nucleici și proteinele absorb lumina UV).

Molecula care servește drept material genetic se așteaptă să - absoarbă lumina UV la lungimile de undă la care este mutagenă.

Efectul mutagen maxim al luminii UV apare la o lungime de undă de 260 nanometri (nm). Atât ADN-ul, cât și ARN-ul absorb lumina UV maximă la 260 nm. În schimb, absorbția maximă a proteinelor are loc la 280 nm, o lungime de undă la care nu se observă efecte mutagene semnificative. Aceste dovezi indirecte susțin ideea că unul dintre acizii nucleici, și nu proteinele , este materialul genetic.

Teste directe: studii de ADN recombinant

Deși dovezile circumstanțiale pe care tocmai le-am descris nu constituie o dovadă directă că ADN-ul este materialul genetic la eucariote, aceste observații i-au stimulat pe oamenii de știință să-și avanseze munca pe baza acestei ipoteze. Astăzi, nu există nicio îndoială cu privire la validitatea acestei concluzii; ADN-ul *este* materialul genetic la toate eucariotele . Cea mai convingătoare dovadă este oferită de analiza moleculară utilizând tehnologia ADN-ului recombinant. Cu această procedură , segmente de ADN eucariot corespunzătoare unor gene specifice sunt izolate și îmbinate în ADN bacterian. Complexul rezultat poate fi inserat într-o celulă bacteriană , iar expresia genelor sale poate fi apoi monitorizată. Dacă se introduce o genă eucariotă , producerea ulterioară a produsului proteic eucariot corespunzător demonstrează direct nu numai că ADN-ul este prezent , ci și că este funcțional în celula bacteriană. Acest lucru a fost observat de nenumărate ori . De exemplu, după inserarea genelor umane care codifică insulina și interferonul în bacterii, aceste bacterii produc aceste produse genetice umane . Când bacteriile se divid, ADN-ul eucariot și ADN-ul gazdă sunt replicate și distribuite celulelor fiice , care, la rândul lor, exprimă și genele umane , creând proteinele corespunzătoare .

Disponibilitatea unor cantități mari de ADN care codifică gene specifice, posibilă prin tehnologia ADN recombinant , a furnizat dovezi directe suplimentare că ADN - ul este materialul genetic. Lucrările efectuate în laboratorul lui Beatriz Mintz au arătat că microinjectarea ADN -ului care codifică gena P - *globinei* ... Dacă o genă umană este introdusă într-un ovul fertilizat de șoarece , acea genă este ulterior găsită și exprimată în țesuturile șoarecilor adulți și este transmisă urmașilor acelor șoareci, unde este , de asemenea, exprimată. Acești șoareci sunt un exemplu de ceea ce se numesc animale transgenice . Alte studii au introdus ADN de șobolan care codifică un hormon de creștere în zigoți de șoarece fertilizați . Aproximativ o treime dintre șoarecii produși în acest mod au crescut până la dublul dimensiunii lor normale , ceea ce indică faptul că ADN -ul străin era prezent și funcțional. Generațiile ulterioare de șoareci au moștenit aceste informații genetice și au crescut, de asemenea , până la o dimensiune mai mare decât cea normală . Acest lucru demonstrează clar că ADN-ul îndeplinește cerința pentru exprimarea informațiilor genetice la eucariote . Vom vedea mai târziu exact cum este stocat, replicat, exprimat și suferă mutații în ADN .

10,5

ARN-ul servește drept material genetic în unele virusuri.

Unele virusuri nu au ADN. La aceste virusuri, se pare că ARN-ul servește drept material genetic - o excepție de la regula generală conform căreia ADN-ul îndeplinește această funcție. În 1956, s-a demonstrat că , dacă ARN-ul era purificat din virusul mozaic al tutunului (TMV) și răspândit pe frunzele de tutun, leziunile caracteristice infecției virale apăreau ulterior pe frunze . Concluzia a fost că ARN-ul este materialul genetic al acestui virus.

În 1965 și 1966, Norman Pace și Sol Spiegelman au demonstrat că ARN-ul fagului *QP* putea fi izolat și replicat *in vitro*. Replicarea depindea de o enzimă, ARN replicaza, care a fost izolată din celulele gazdă E. *coli în urma unei infecții normale. Când ARN-ul* replicat *in vitro* a fost adăugat la protoplastele E. coli , a avut loc infecția virală și multiplicarea (transfecția). Astfel, ARN-ul sintetizat într-o eprubetă poate servi drept material genetic în acești fagi, direcționând producerea tuturor componentelor necesare pentru reproducerea virală. Deși multe virusuri, cum ar fi virusul T2 utilizat de Hershey și Chase, folosesc ADN-ul ca material genetic, un alt grup de virusuri care conțin ARN merită menționat. Acestea sunt retrovirusurile, care se replică într-un mod neobișnuit. ARN-ul lor servește drept șablon pentru sintetizarea unei molecule de ADN complementare . Procesul , numit transcripție inversă, este dirijat de o enzimă ADN polimerază dependentă de ARN numită transcriptază inversă. Acest intermediar ADN poate fi încorporat în genomul celulei gazdă , iar atunci când ADN-ul gazdă este transcris, se produc copii ale cromozomului ARN al retrovirusului original. Grupul retrovirusurilor include , printre altele, virusul imunodeficienței umane (HIV), care provoacă SIDA, precum și virusuri ARN care provoacă tumori.

10.6

Cunoașterea chimiei acizilor nucleici este esențială pentru înțelegerea structurii ADN-ului

După ce am stabilit importanța crucială a ADN-ului și ARN-ului în procesele genetice, vom prezenta acum pe scurt structurile chimice ale acestor molecule. După cum vom vedea, componentele structurale ale ADN-ului și ARN-ului sunt foarte similare. Această similaritate chimică este importantă pentru coordonarea funcțiilor pe care aceste molecule le îndeplinesc în timpul exprimării genelor. La fel ca alte grupuri majore de biomolecule organice (proteine, carbohidrați și lipide), chimia acizilor nucleici se bazează pe o serie de elemente constitutive similare care polimerizează pentru a forma lanțuri de lungimi variabile .

Nucleotide: elementele constitutive ale acizilor nucleici

ADN-ul este un acid nucleic, iar nucleotidele sunt elementele constitutive ale tuturor moleculelor de acid nucleic . Aceste unități structurale, uneori numite mononucleotide, constau din trei componente esențiale : o bază azotată, un zahăr pentozidic (un zahăr cu cinci atomi de carbon) și o grupare fosfat. Există două tipuri de baze azotate: purine , un inel dublu cu nouă membri , și pirimidine, un inel cu șase membri .

Acizii nucleici conțin în general două tipuri de purine și trei tipuri de pirimidine. Cele două purine sunt adenina și guanina , abreviate A și respectiv G. Cele trei pirimidine sunt citozina, timina și uracilul, abreviate C, T și respectiv U. Figura 10.7(a) prezintă structura chimică a A , G, C, T și U. Atât ADN-ul , cât și ARN-ul conțin A, C și G ; cu toate acestea, numai ADN-ul conține baza T , în timp ce numai ARN-ul conține baza U. Fiecare atom de azot sau de carbon din structurile inelare ale purinelor și pirimidinelor este desemnat printr -un număr (fără semnul prim). Rețineți că, în majoritatea cazurilor , atomii corespondenți din cele două inele au numere diferite .

Denumirile acizilor nucleici sunt derivate de la zahărul pentozic pe care îl conțin. Acizii ribonucleici (ARN) conțin riboză, în timp ce acizii dezoxiribonucleici (ADN) conțin dezoxiriboză . Figura 10.7 (b) prezintă structura ciclică a acestor două zaharuri pentozice. Fiecare atom de carbon se distinge printr- un număr cu semn prim (de exemplu , Cl', C-2'). După cum se poate observa comparând riboza cu dezoxiriboza , aceasta din urmă are un atom de hidrogen în poziția C-2' în loc de o grupare hidroxil. Astfel , ARN-ul se distinge de ADN prin prezența unei grupări hidroxil în poziția C -2'. În absența grupării hidroxil C-2' , zahărul este numit mai specific 2 -dezoxiriboză.

Dacă o moleculă este compusă dintr -o bază purinică sau pirimidinică și un zahăr riboză sau dezoxiriboză, aceasta formează o unitate chimică numită nucleozidă. Dacă la o nucleozidă se adaugă o grupare fosfat, noua moleculă se numește nucleotidă . Nucleozidele și nucleotidele sunt denumite în funcție de baza azotată specifică (A , T, G, C sau U) care face parte din moleculă. Figura 10.8 prezintă structura nucleozidelor și nucleotidelor, precum și nomenclatura utilizată pentru a le denumi .

Legătura dintre cele trei componente ale unui nucleotid este foarte specifică. Atomul C-1' al zahărului este legat chimic de baza azotată. Dacă baza este o purină, atomul N-9 este legat covalent de zahăr . Dacă baza este o pirimidină, atomul N1 este legat de zahăr. În dezoxiribonucleotide , gruparea fosfat poate fi atașată la atomul C-2', C-3' sau C-5' al zahărului. Configurația C -5'

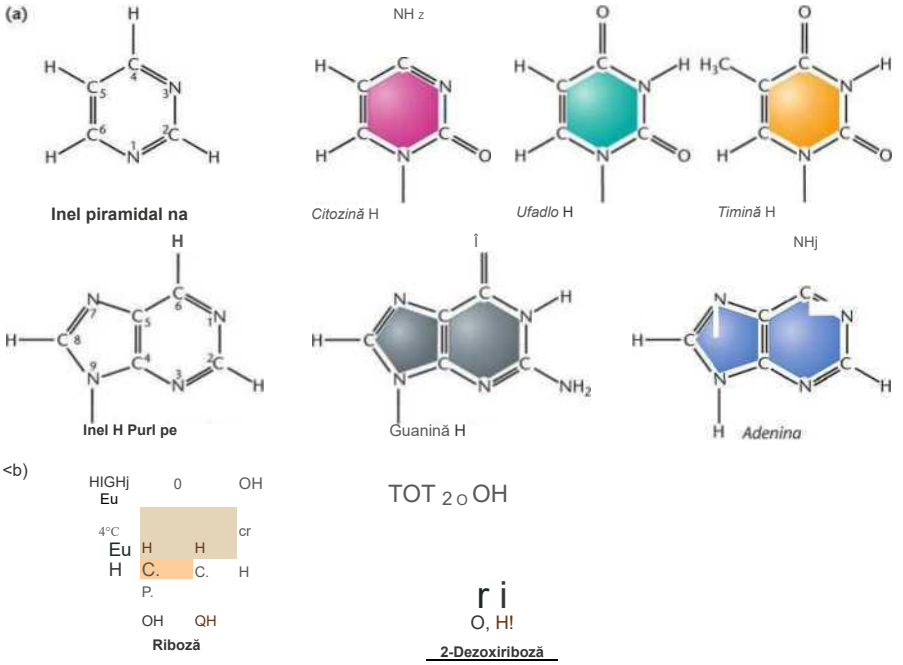
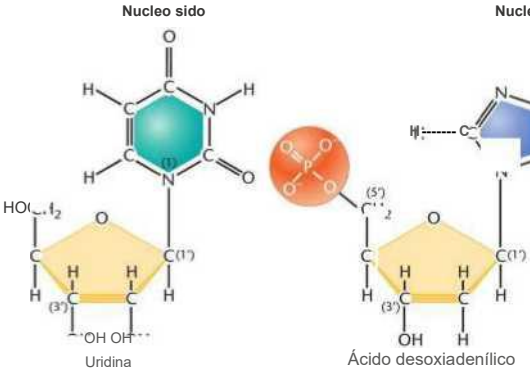


FIGURA 1.7 (a) Structura chimică a pirimidinelor *şi* purinelor, care servesc ca baze azotate în ARN şi ADN. Convenţia de numerotare pentru atomii de carbon *şi* azot care alcătuiesc cele două tipuri de baze este prezentată în structurile din stânga, în figură. (b) Structuri chimice inelare ale ribozei *şi* 2-dezoxiribozei, care servesc ca zaharuri pentozidice în ARN şi, respectiv, ADN.



Ribonucleósidos	Ribo nucleótidos
Adenosina Citosina Guanosina Uridina	Ácido ade nil Ico Ácido cítidíliço Ácido guanílico Ácido uridílico
Desoxirrlbonucleósldo*	**Oesoxinrlbonucfeótldos**
Desoxiadenosina Desoxicitosina Desoxiguanosina Desoxitrmidina	Ácido desoxiadenílico Ácido desoxicitídílico Ácido desoxiguanílico Ácido desoxitimid ilion

FIGURA 10^8 Structuri și denumiri ale nucleotidelor *și* acizilor nucleici din ARN și ADN P

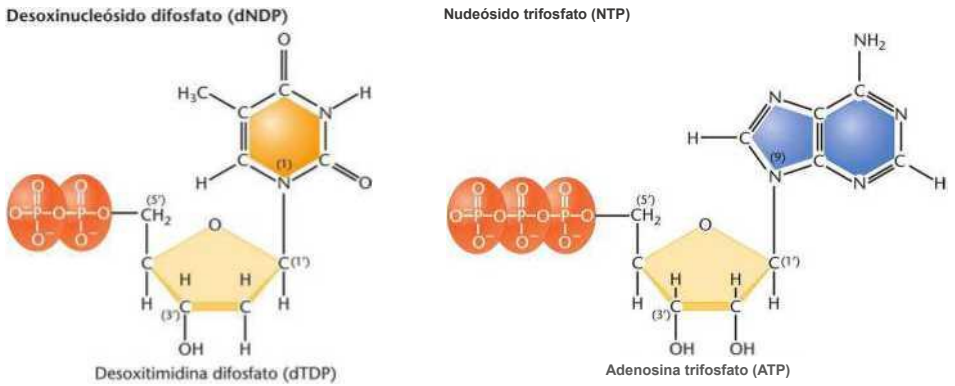


FIGURA 10.9 Structurile difosfaților și trifosfaților nucleozidici. Dezoxitimidina difosfat și adenozin trifosfat sunt ilustrate aici.

Fosfatul este prezentat în Figura 10.8. Este cea mai comună formă în sistemele biologice și se găsește în ADN și ARN.

Nucleozide difosfat și trifosfat

Nucleotidele pot fi descrise și ca monofosfați nucleozidici (NMP). Adăugarea uneia sau a două grupări fosfat produce difosfați nucleozidici (NDP) și respectiv trifosfați (NTP), așa cum se arată în Figura 10.9. Forma trifosfat este importantă deoarece servește ca moleculă precursoare în timpul sintezei acidului nucleic în celulă (*vezi* Capitolul 11). În plus, adenozin trifosfatul (ATP) și guanozin trifosfatul (GTP) sunt importante pentru bioenergetica celulară datorită cantității mari de energie implicate în adăugarea sau îndepărtarea grupării fosfat terminale. Hidroliza ATP sau GTP la ADP sau GDP și fosfat anorganic (Pi) eliberează o cantitate mare de energie în interiorul celulei . Atunci când aceste conversii chimice sunt cuplate cu alte reacții, energia produsă poate fi utilizată pentru a conduce aceste reacții. Rezultatul este că atât ATP, cât și GTP sunt implicate în multe activități celulare, inclusiv numeroase fenomene genetice.

Polinucleotide

Legătura dintre două mononucleotide constă dintr- o grupare fosfat legată de două zaharuri. Se formează apoi o legătură fosfodiesteric , deoarece acidul fosforic este legat de doi alcooli (grupările hidroxil ale celor două zaharuri) printr-o legătură esterică pe ambele părți. Figura 10.10(a) prezintă legătura fosfodiesteric rezultată în ADN. Aceeași legătură se găsește și în ARN . Fiecare structură are un capăt C-5' și un capăt C-3'. Unirea a două nucleotide formează o dinucleotidă ; cea a trei nucleotide, o trinucleotidă și așa mai departe. Lanțurile scurte formate din până la aproximativ 30 de nucleotide legate se numesc

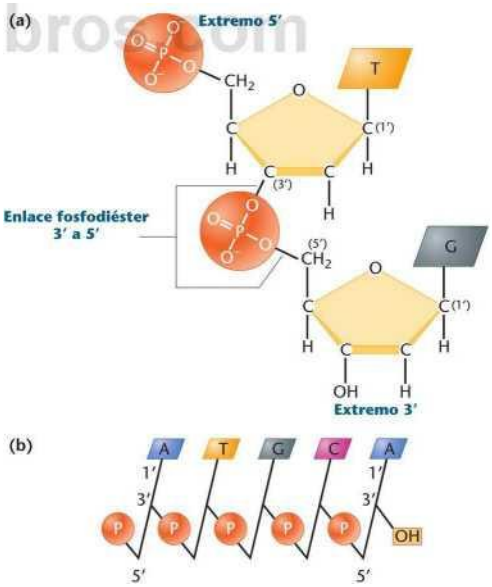


FIGURA 10.10 (a) Unirea a două nucleotide prin formarea unei legături fosfodiesterice C-3'-CS' (3'-5') producând o dinudeotidă. (b) Notație abreviată pentru un lanț polinudeotidic.

de oligonucleotide; lanțurile mai lungi se numesc polinucleotide.

Întrucât desenarea structurilor polinucleotidice , cum ar fi cele prezentate în Figura 10.10(a), este un proces complex și consumator de timp , a fost concepută o metodă schematică simplificată [Figura 10.10(b)]. Liniile aproape verticale reprezintă zahărul pentozidic; baza azotată este atașată la capătul superior în poziția Cl'. Linia diagonală cu P în mijloc conectează poziția C-3' a unui zahăr de poziția C-5' a zahărului vecin, reprezentând astfel legătura fosfodiesteric. Sunt utilizate diverse modificări ale acestei metode simplificate , deși toate pot fi înțelese urmând aceste instrucțiuni.

tetranucleotidelor a lui Levene (descrisă anterior în acest capitol) a fost în general acceptată înainte de 1940 , cercetările din deceniile următoare au arătat că aceasta era incorectă. S-a demonstrat că ADN-ul nu conținea neapărat cantități echimolare din toate cele patru baze. În plus, s-a determinat că greutatea moleculară a moleculelor de ADN se situează între 10^6 și 10^{-12} daltoni, mult mai mare decât cea a unui tetranucleotid. Opinia actuală despre ADN este că acesta constă din lanțuri polinucleotidice enorm de lungi.

Lanțurile lungi de nucleotide justifică greutatea moleculară mare a ADN-ului și explică cea mai importantă proprietate a sa - stocarea unor cantități enorme de informații genetice. Dacă fiecare dintre pozițiile nucleotidelor din acest lanț lung poate fi ocupată de oricare dintre cele patru nucleotide, sunt posibile variații extraordinare . De exemplu, un polinucleotid lung de doar 1.000 de nucleotide poate fi aranjat în 4.100 de moduri diferite , fiecare diferit de toate celelalte secvențe posibile . Această variație potențială a structurii moleculare este esențială dacă ADN-ul urmează să stocheze cantitățile enorme de informații chimice necesare pentru a dirija activitățile celulare.

10.7

Structura ADN-ului este esențială pentru înțelegerea funcției sale

În secțiunile precedente ale acestui capitol, s-a stabilit că ADN-ul este materialul genetic al tuturor organismelor (cu excepția anumitor virusuri) și au fost furnizate detalii despre componentele chimice de bază care alcătuiesc acizii nucleici. Ceea ce a mai rămas de descifrat a fost structura precisă a ADN-ului. Adică, cum sunt organizate lanțurile polinucleotidice în ADN-ul care servește drept material genetic? Este ADN-ul compus dintr-o singură catenă sau din mai multe? Dacă ultima variantă este corectă, cum sunt legate chimic catenele între ele? Se ramifică catenele ? Și, chiar mai important, cum se leagă structura acestei molecule de diversele funcții genetice ale ADN-ului (de exemplu, depozitarea, expresia, replicarea și mutația)?

Între 1940 și 1953, mulți oameni de știință au fost interesați să descifreze structura ADN - ului. Erwin Chargaff, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin, Linus Pauling, Francis Crick *și* James Watson au *căutat* informații care să poată răspunde la ceea ce mulți considerau cea mai importantă și intrigantă întrebare din istoria biologiei : *cum servește ADN-ul drept bază genetică pentru procesele vitale ?* Se credea că răspunsul va depinde în mare măsură de structura chimică și organizarea moleculei de ADN , având în vedere funcțiile complexe și ordonate care îi sunt atribuite .

În 1953, James Watson și Francis Crick au propus ideea *că* structura ADN - ului este sub forma unei duble spirale. Ei au publicat modelul lor într-un scurt articol în revista Nature . (Traducerea completă a articolului original este reprodusă la pagina 279.) Într -un fel, acest articol a marcat sfârșitul unei cariere științifice extrem de competitive. Cartea lui Watson , *„Dubla helix”,* Narează latura umană a dramei științifice care a dus în cele din urmă la elucidarea structurii ADN - ului .

Datele disponibile lui Watson și Crick, cruciale pentru dezvoltarea propunerii lor , au provenit în principal din două surse: (1) analiza compoziției de bază a probelor de ADN hidrolizat și (2) studii de difracție cu raze X ale ADN-ului. Succesul analitic al lui Watson și Crick poate fi atribuit concentrării lor pe construirea unui model care să se potrivească datelor existente . Dacă comparăm - structura ADN - ului cu un puzzle, Watson și Crick, care lucrau la Laboratorul Cavendish din Cambridge , Anglia, au fost primii care au reușit să îmbine toate piesele .

Înainte de a intra în detaliile acestei descoperiri de amploare , este interesant să subliniem câteva fapte despre istoriile personale ale lui James Watson și Francis Crick. Watson și- a început studiile universitare de licență la Universitatea din Chicago la vârsta de 15 ani , fiind inițial interesat de ornitologie . Ulterior, și- a continuat studiile doctorale la Universitatea din Indiana , unde a lucrat cu viruși. În 1953, la doar 24 de ani , el și Crick au propus teoria dublei helixuri. Crick , considerat acum unul dintre cei mai mari biologi teoreticieni ai timpului nostru , a studiat fizica la University College London , iar în timpul celui de-al Doilea Război Mondial , s -a dedicat cercetării militare. Când a colaborat cu Watson, avea 35 de ani și efectua studii de difracție cu raze X ale polipeptidelor și proteinelor ca student absolvent . În ziua celei mai importante descoperiri a lor , se spune că Crick a mers la Eagle Pub din Cambridge, unde amândoi mâncau frecvent , și a anunțat suficient de tare pentru ca toată lumea să audă: „Am descoperit…”

„Secretul vieții.” Acum, că au trecut mai bine de 50 de ani, trebuie recunoscut faptul că mulți oameni de știință ar fi de acord cu această afirmație.

Studii privind compoziția bazelor

Între 1949 și 1953, Erwin Chargaff și colaboratorii săi au folosit metode cromatografice pentru a separa cele patru baze din probele de ADN de la diverse organisme. Folosind metode cantitative, au determinat cantitățile celor patru baze din fiecare sursă. Tabelul 10.3(a) oferă o parte din datele originale ale lui Chargaff. Părțile (b) și (c) ale tabelului prezintă informații mai recente despre compoziția în baze a altor organisme care întăresc descoperirile lui Chargaff. După cum vom vedea , datele lui Chargaff au fost extrem de importante pentru succesul lui Watson și Crick în dezvoltarea modelului cu dublă helix al ADN-ului. Pe baza acestor date, se pot trage următoarele concluzii:

1. După cum se arată în Tabelul 10.3(b), numărul de reziduuri de adenină este proporțional cu numărul de reziduuri de timină din ADN (coloanele 1, 2 și 5). În mod similar, numărul de reziduuri de guanină este proporțional cu numărul de reziduuri de citozină (coloanele 3, 4 și 6).
2. Pe baza acestei proporționalități, suma purinelor (A + G) este egală cu suma pirimidinelor (C + T), așa cum se arată în coloana 7 .
3. Procentul de (G + C) nu este neapărat egal cu procentul de (A + T). După cum se poate observa, relația dintre cele două valori variază foarte mult între organisme, așa cum se arată în coloana 8 și este evidențiat în partea (c) a tabelului 10.3.

Aceste descoperiri indică un model clar în compoziția în baze a moleculelor de ADN. Aceste date oferă, de asemenea, un indiciu inițial pentru rezolvarea puzzle -ului ADN . În plus, ele resping complet ipoteza tetranucleotidelor a lui Levene , care afirma că cele patru baze sunt prezente în cantități egale .

Analiza difracției de raze X

Când fibrele unei molecule de ADN sunt bombardate cu raze X, razele X se împrăștie (difractă) într -un model care depinde de structura atomică a moleculei . Modelul de difracție poate fi capturat pe film fotografic sub formă de pete și analizat pentru a obține indicii despre forma regulată și regularitățile din cadrul moleculei. Acest proces, analiza prin difracție de raze X, a fost aplicat la

Date privind compoziția bazelor ADN

(a) Date Chargaff*

Raport molar*

1 234(c) Conținutul de C+G în diverse organisme

Organism/sursă	A	T	G	C	Organism	%G + c
Timoteiul lui Boi	26	25	21 de ani	16	Fagul T2	36,0
Splina de bou	25	24	20	15	*Drosophila*	45,0
Drojdie	24	25	14	13	Porumb	49.1
Bacilul tuberculului de pasăre	12	11	28 de ani	26	*Euglenă*	53,5
Spermă umană	29	31 de ani	18 ani	18 ani	*Neurospora*	53,7

(b) compoziția bazelor ADN-ului, din mai multe surse

	Compoziția de bază				Raportul de bază		Raportul de bază combinat	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Corp	THE	T.	G.	V	LA	Condiții generale	(A + G)/(C + T)	(A + T)/(C + C)
Uman	30,9	29,4	19,9	19,8	1,05	1,00	1,04	1,52
țipar de mare	32,8	32.1	17,7	17.3	1,02	1,02	1,02	1,58
E. coli	24,7	23,6	26,0	25,7	1,04	1,01	1,03	0,93
Sarcina lutea	13,4	12,4	37,1	37,1	1,08	1,00	1,04	0,35
Bacteriofagul T7	26,0	26,0	24,0	24,0	1,00	1,00	1,00	1,08

• *Sursă:* **Chargaff, 1950.**
* **Moli de constituenți azotați per mol de P. (Adesea , recuperarea a fost mai mică de 100%).**

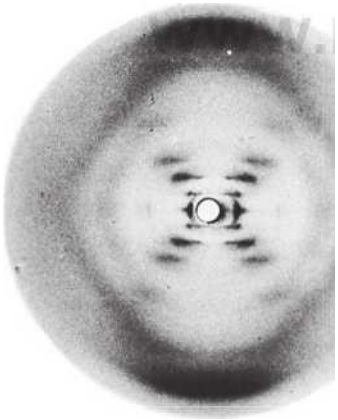
Această tehnică a fost utilizată pentru prima dată de Linus Pauling și alți chimiști pentru a studia structura proteinelor. William Astbury a testat-o pe ADN încă din 1938. În jurul anului 1947, el a detectat o periodicitate de 3,4 angstromi (Å) †††în structura moleculei, ceea ce i-a sugerat că bazele erau așezate una peste alta ca niște monede.

Între 1950 și 1953, Rosalind Franklin, lucrând în laboratorul lui Maurice Wilkins, a obținut date mai bune de difracție cu raze X din probe de ADN mai purificate (Figura 10.11). Cercetările sale au confirmat periodicitatea de 3,4 Å observată de Astbury și au sugerat că structura ADN-ului era un fel de helix. Cu toate acestea, ea nu a propus un model definitiv. Pauling analizase lucrările lui Astbury și ale altora și propusese în mod eronat că ADN-ul era o triplă helix.

Modelul Watson și Crick

Watson și Crick și-au publicat analiza structurii ADN-ului în 1953. Construind modele bazate pe parametrii menționați mai sus, ei au propus forma de dublă spirală a ADN-ului, prezentată în Figura - 10.12(a).

FIGURA 10.11 Fotografie de difracție cu raze X realizată de Rosalind Franklin folosind forma B a fibrelor de ADN purificate. Arcurile întunecate de la periferie arată aspecte strâns legate de dimensiunile moleculei, permițând oamenilor de știință să estimeze periodicitatea bazelor azotate, care sunt separate de 3,4 Å. Modelul intern cruciform pătat arată aspectul general al moleculei și indică natura sa elicoidală.



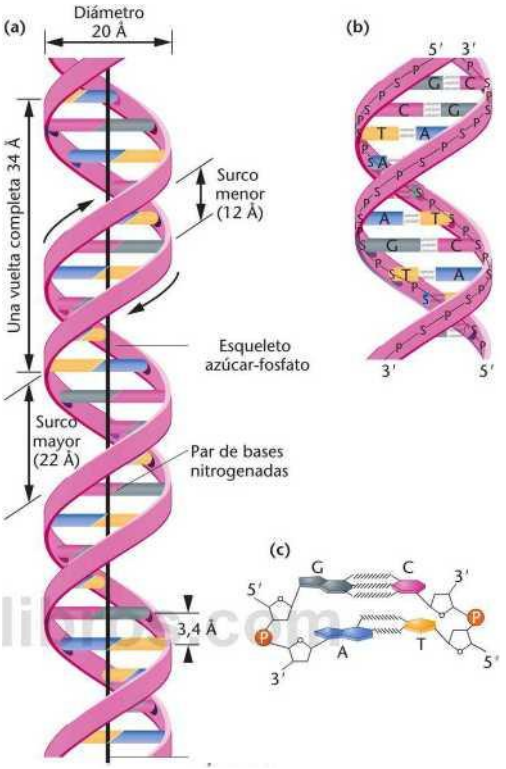


FIGURA 10.12 (a) Doble hélice del ADN propuesta por Watson y Crick. Las cintas representan el esqueleto azúcar-fosfato, y los escalones horizontales constituyen los pares de bases nitrogenadas, de las que hay 10 por cada vuelta. Pueden verse los surcos mayor y menor. La barra vertical representa el eje central, (b) Imagen ampliada de las bases, los azúcares, los fosfatos y los enlaces de hidrógeno de la hélice, (c) Representación del carácter antiparalelo de la hélice y del apilamiento horizontal de las bases.

Acest model are următoarele caracteristici principale :

1. Două lanțuri lungi de polinucleotide sunt înfășurate în jurul unei axe centrale, formând o dublă helix dextrocită .
2. Cele două lanțuri sunt antiparalele; adică orientarea C-5'-către C-3' este în direcții opuse.
3. Bazele celor două lanțuri sunt structuri plate perpendiculare pe axă; acestea sunt „așezate" una peste alta, separate de 3,4

†††În prezent, se preferă măsurătorile în nanometri (nm) (1 nm = io A).

FIGURA 10.13 Formele dextrogitatorie și levorgitatorie ale ADN-ului. Rețineți că acestea sunt imagini în oglindă.

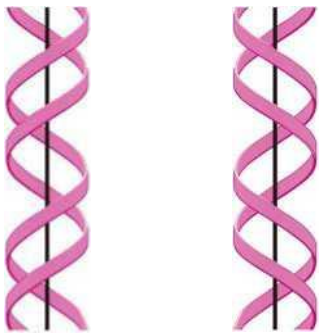
Å (0,34 nm) și sunt situate în interiorul dublei helixuri.

4. Bazele azotate ale catenelor opuse sunt *împerecheate* ca urmare a formării legăturilor de hidrogen; în ADN sunt permise doar împerecherile A=T și G=C .
5. Fiecare rotație completă a helixului are o lungime de 34 Å (3,4 nm); prin urmare, fiecare rotație a helixului are o lungime echivalentă cu o serie de 10 perechi de baze.
6. Un șanț major și un șanț minor alternant se înfășoară pe întreaga lungime a moleculei.
7. Dubla helix măsoară 20 Å (2,0 nm) în diametru.

Condiția de împerechere a bazelor (punctul 4 de mai sus) este cea mai importantă caracteristică a modelului atunci când vine vorba de explicarea funcțiilor genetice. Cu toate acestea, înainte de a o discuta în detaliu, este necesar să menționăm alte caracteristici importante. În primul rând, aranjamentul antiparalel al celor două catene este unul dintre aspectele cheie ale modelului cu dublă spirală. În timp ce o catenă se întinde în direcția 5' către 3' (care ni se pare a fi în sus), cealaltă catenă se întinde în direcția 3' către 5' (apărând astfel inversată). Acest lucru este ilustrat în Figurile 10.12(b) și (c). Având în vedere unghiurile de legătură din structurile diferitelor componente nucleotidice , dubla spirală nu ar putea fi construită cu ușurință dacă ambele catene ar fi paralele.

În al doilea rând, natura dextrogică a helixului modelat de Watson și Crick poate fi mai bine apreciată prin compararea acesteia cu versiunea sa stângogică, care este o imagine în oglindă a acesteia, așa cum se arată în Figura 10.13. Conformația spațială a helixului dextrogică este mai consistentă cu datele disponibile lui Watson și Crick, deși este adevărat că există o formă alternativă de ADN (ADN-Z) care are forma unei helix stângogice, așa cum vom vedea mai târziu.

Cheia modelului propus de Watson și Crick este specificitatea împerecherii bazelor . Datele lui Chargaff sugerează că cantitățile de A și T sunt egale, precum și cele de G și C sunt , de asemenea , egale . Watson și Crick și- au dat seama că, dacă A se împerechează



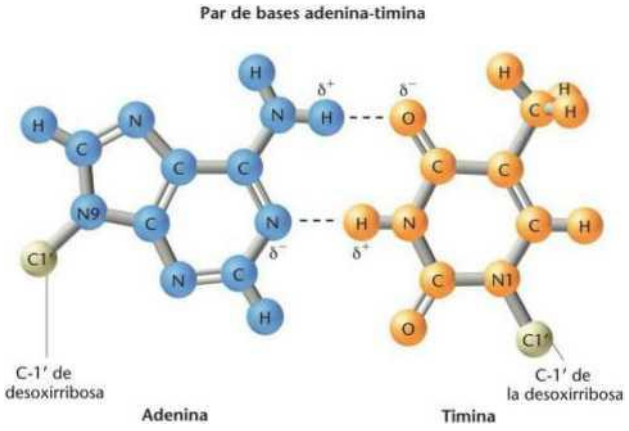
Doble hélice dextrógira Doble hélice levógira

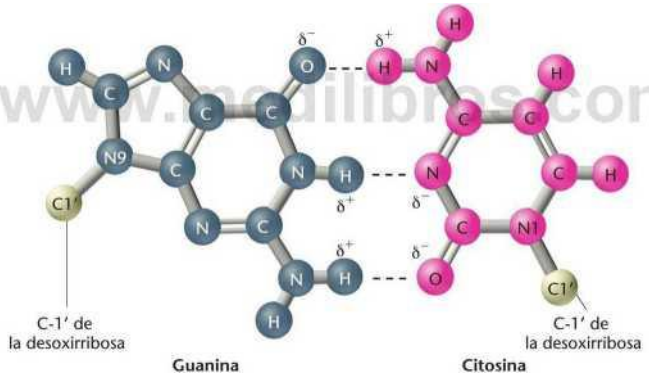
cu T și C cu G, aceste proporții ar fi explicate și au văzut , de asemenea, că o astfel de împerechere ar putea apărea ca urmare a legăturilor de hidrogen dintre perechile de baze [Figura 10.12(b)], ceea ce ar oferi și stabilitatea chimică necesară pentru a menține împreună cele două lanțuri . Acest aranjament de componente produce șanțurile majore și minore de-a lungul moleculei . În plus , fiecare purină (A sau G) este împerecheată cu o pirimidină (T sau C) pe fiecare „treaptă a scării în spirală" a helixului propus , justificând diametrul de 20 Å (2 nm) sugerat de studiile de difracție cu raze X.

Împerecherea specifică de baze , A = T și G = C , stă la baza conceptului de complementaritate, care descrie afinitatea chimică dintre baze, asigurată de legăturile de hidrogen . După cum vom vedea, complementaritatea este foarte importantă în procesele de replicare a ADN-ului și de exprimare a genelor .

Există două întrebări care merită o atenție specială . În primul rând, de ce nu sunt posibile alte perechi de baze ? Watson și Crick au respins perechile A - G și C - T deoarece acestea reprezintă perechi purină-purină , respectiv pirimidină-pirimidină. Aceste - perechi ar produce diametre alternante mai mari de 20 Å și mai mici de 20 Å , datorită dimensiunilor respective ale inelelor purinelor și pirimidinelor . În plus, configurațiile tridimensionale formate de aceste perechi nu produc o aliniere care să permită legăturile de hidrogen . Acesta este motivul pentru care perechile A = C și G = T au fost , de asemenea , respinse , chiar dacă acestea constau dintr -o purină și o pirimidină .

A doua întrebare se referă la proprietățile legăturilor de hidrogen . Care este natura exactă a acestei punți și este ea suficient de puternică pentru a stabiliza helixul? O legătură de hidrogen este o atracție electrostatică foarte slabă între un atom de hidrogen legat covalent și un atom cu o pereche liberă de electroni. Atomul de hidrogen dobândește o sarcină parțială pozitivă, în timp ce perechea liberă de electroni - caracteristică atomilor de oxigen și azot legați covalent - dobândește o sarcină parțială negativă . Aceste sarcini opuse sunt responsabile pentru o atracție chimică slabă , care stă la baza legăturii de hidrogen . Orientată ca în helixul dublu , adenina formează două legături de hidrogen cu timina , iar guanina formează trei legături de hidrogen cu citozina (Figura 10.14) . Deși două sau trei legături de hidrogen izolate sunt energetic foarte slabe , mii de legături în tandem (ca în helixul dublu) pot crea o legătură puternică .





www.medilibros.com

- - - Legături de hidrogen

FIGURA 10.14 Modele de tip bilă și băț ale perechilor de baze A=T și G= C. Liniile punctate (~ -) reprezintă legăturile de hidrogen care se formează între baze.

găsite în lanțuri lungi de polinucleotide) oferă o mare stabilitate helixului.

Un alt factor de stabilizare este aranjamentul zaharurilor și bazelor de-a lungul axei. În modelul Watson și Crick, bazele azotate hidrofobe (care se tem de apă) sunt stivuite aproape orizontal pe interiorul axei și sunt astfel protejate de mediul apos care înconjoară molecula din interiorul celulei. Catena hidrofilă (care iubește apa) zahăr-fosfat este situată pe exteriorul axei, unde ambele componente pot interacționa cu apa. Acest aranjament molecular oferă o stabilitate chimică semnificativă helixului.

O analiză mai recentă și mai precisă a structurii ADN-ului decât cea care a servit drept bază pentru modelul Watson-Crick a relevat o diferență structurală minoră între substanță și model. Măsurarea precisă a numărului de perechi de baze pe rotație a dat o valoare de 10,4, în loc de 10,0 prezisă de Watson și Crick. În modelul clasic, fiecare pereche de baze este rotită cu 36° în jurul axei helixului față de perechea de baze adiacentă, în timp ce aceste modele mai noi...

Structura moleculară a acizilor nucleici: structura acidului dezoxiribonucleic

Dorim să sugerăm o structură pentru sarea acidului dezoxiribonucleic (ADN). Această structură are caracteristici noi de interes biologic considerabil. Pauling *şi* Corey au propus deja o structură pentru acizii nucleici. Acești autori ne-au furnizat cu amabilitate manuscrisul lor înainte de publicare. Modelul lor constă din trei lanțuri înfășurate unul în jurul celuilalt, cu fosfații situați în apropierea axei fibrei și bazele la exterior. În opinia noastră, această structură este nesatisfăcătoare din două motive: (1) Credem că materialul care generează modelele de raze X este sarea, nu acidul liber. Fără atomii de hidrogen acizi, este neclar ce forțe vor menține structura laolaltă, mai ales că fosfații încărcați negativ în apropierea axei s-ar respinge reciproc. (2) Unele dintre distanțele van der Waals par a fi prea mici.

Fraser a sugerat, de asemenea, o altă structură tricatenară (în curs de publicare). În modelul său, fosfații sunt la exterior, iar bazele la interior, unite prin legături de hidrogen. Această structură, așa cum este descrisă, este slab definită și, din acest motiv, nu o vom comenta în continuare.

Dorim să propunem o structură radical diferită pentru sarea acidului dezoxiribonucleic. Această structură are două lanțuri elicoidale înfășurate în jurul aceleiași axe. Am făcut presupunerile chimice normale, și anume că fiecare lanț este format din grupări fosfodiesterice care leagă reziduuri de zD-dezoxiribofuranoză cu legături 3', 5'. Cele două lanțuri (dar nu și bazele lor) formează un duplex perpendicular pe axa fibrei. Ambele lanțuri sunt dextrogice, dar secvențele de atomi din cele două lanțuri ale duplexului se desfășoară în direcții opuse. Fiecare lanț seamănă în linii mari cu modelul Furberg nr . 1 ; adică [bazele] sunt în interiorul helixului , iar fosfații în exterior . Configurația zaharurilor și a atomilor din apropiere seamănă cu configurația Furberg „ normală " , astfel încât zahărul este aproximativ perpendicular pe baza de care este atașat. În fiecare lanț, există un reziduu la fiecare 3,4 Å în direcția z. Am presupus un unghi de 36° între reziduurile adiacente ale aceluiași lanț, astfel încât structura se repetă după 10 reziduuri ale fiecărui lanț; adică, după 34 Å, distanța unui atom de fosfor față de axa fibrei este de 10 Å. Deoarece fosfații sunt la exterior, cationii pot accesa cu ușurință aceștia .

Structura este deschisă , iar conținutul său de apă este destul de ridicat. Dacă ar fi avut un conținut de apă mai mic, ne-am fi așteptat ca bazele să se încline , ceea ce ar face structura mai compactă.

Trăsătura originală a acestei structuri este modul în care cele două lanțuri sunt ținute împreună de purine și pirimidine. Planurile bazelor sunt perpendiculare pe axa fibrei . Acestea sunt unite în perechi: o bază a unui lanț este legată prin legături de hidrogen de o bază a celuilalt lanț, astfel încât acestea se află una lângă alta, cu coordonate z identice. În fiecare pereche, pentru ca punțile să se formeze , una trebuie să fie o purină , iar cealaltă o pirimidină. Legăturile de hidrogen se stabilesc după cum urmează : purina la poziția 1 cu pirimidina la poziția 1; purina la poziția 6 cu pirimidina la poziția 6 .

Dacă presupunem că, în această structură, bazele se găsesc doar în formele lor tautomerice cele mai plauzibile (adică, cu configurații ceto mai degrabă decât cu configurații enol), constatăm că se pot lega doar anumite perechi de baze . Aceste perechi sunt: adenina (purină) cu timină (pirimidină) și guanina (purină) cu citozină (pirimidină).

Cu alte cuvinte, și conform acestei presupuneri , dacă un membru al perechii din oricare dintre catene este o adenină, celălalt membru trebuie să fie o timină ; același lucru este valabil și pentru guanină și citozină. Secvența de baze a unei singure catene nu pare a fi restricționată în niciun fel. Cu toate acestea, dacă se pot forma doar perechi de baze specifice , rezultă că pentru o anumită secvență de baze într -o catenă, secvența de baze a celeilalte catene este determinată automat .

Experimental, [5] -a constatat că , în acidul dezoxiribonucleic, raportul dintre cantitatea de adenină și timină și raportul dintre cantitatea de guanină și citozină sunt întotdeauna foarte apropiate de unitate.

Este probabil imposibil să se construiască această structură cu riboza zaharidă în loc de dezoxiriboză, deoarece atomul de oxigen suplimentar ar face ca un contact van der Waals să fie prea apropiat.

Datele cu raze X publicate anterior ^{[5,6}] asupra acidului dezoxiribonucleic sunt insuficiente pentru a demonstra riguros structura noastră . Tot ce putem spune este că este în general compatibilă cu datele experimentale, dar ar trebui considerată încă nedemonstrată până când nu va fi comparată cu rezultate mai precise . Unele dintre acestea vor fi prezentate în comunicări viitoare . Când am proiectat structura noastră , nu eram la curent cu detaliile rezultatelor prezentate în aceste comunicări , așa că structura noastră se bazează în principal, deși nu în întregime, pe date experimentale publicate și argumente stereochimice .

Nu am omis faptul că împerecherea bazelor pe care am postulat-o sugerează imediat un posibil mecanism de copiere a materialului genetic. Detaliile complete ale structurii, inclusiv condițiile presupuse la construirea acesteia, împreună cu un set de coordonate atomice , vor fi publicate într- un alt articol .

Îi suntem îndatorați Dr. Jerry Donohue pentru sfaturile și criticile sale constante , în special în ceea ce privește distanțele interatomice. De asemenea ,

am fost stimulați de noțiunile generale ale rezultatelor experimentale nepublicate și de ideile de Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. RE Franklin și colaboratorii săi de la King's College London. Unul dintre noi (JDW) are o bursă de la Fundația Națională pentru Paralizie Infantilă.

JD Watson și FHC Crick

Consiliul de Cercetare Medicală, Unitatea pentru Structura Moleculară a Sistemelor Biologice, Laboratorul Cavendish, Cambridge , Anglia.

[1] **Pauling, L. și Corey, RB** *Nature,* **171, 346 (1953);** *Proc. US Nat. Acad. Sci.,* **39, 84 (1953).**
[2] **Furberg, S.,** *Acta Chem. Scand.,* **6, 634 (1952)**
[3] **Chargaff, E. Para referencias véase Zamenhof, S. Brawerman, G. y Chargaff, E.,** *Biochim et Biophys. Acta,* **9, 402 (1952).**
[4] **Wyatt, G. R.J.** *Gen. Physiol.,* **36, 201 (1952).**
[3] **Astbury, W.T.,** *Simptome, Sociologie Exp., Biologie 1, Acid Nucleic,* **66 (Camb. Univ. Press, 1947).**
[6] **Wilkins, M. H. F. și Randall, J. T.,** *Biochim et Biophys. Acta,* **10, 192 (1953).**

Sursa: **Reimpreso con permiso de Macmillan Publishers Ltd:** *Nature,* **«Structura moleculară a acizilor nucleici : o structură pentru acidul nucleic dezoxinboză » de F. H. C. Crick și J. D. Watson ,** *Nature,* **Vol. 171, n.° 4356, pag. 737-38 Copyright © 1953 www.nature.com .**

Datele indică o rotație de 34,6°. Rezultatul este că există puțin peste 10 perechi de baze pentru fiecare rotație de 360 °.

Modelul Watson-Crick a avut un efect imediat asupra disciplinei emergente a biologiei moleculare. Încă din articolul lor inițial din 1953 din *Nature,* autorii au afirmat: „Nu ne scapă faptul că asocierea specifică pe care o postulăm sugerează un posibil mecanism de copiere a materialului genetic." Două luni mai târziu, într-un al doilea articol din aceeași revistă *Nature,* Watson și Crick au dezvoltat această idee, sugerând un model specific de replicare a ADN-ului - *modelul semiconservativ al replicării* (descris în Capitolul 11). Acest al doilea articol făcea aluzie și la două concepte noi: (1) stocarea informațiilor genetice în secvența de baze și (2) mutațiile sau modificările genetice care ar rezulta dintr-o modificare a bazelor. Aceste idei au primit un sprijin experimental enorm din 1953 și sunt acum universal acceptate.

Sinteza ideilor lui Watson și Crick a fost crucială pentru studiile ulterioare în genetică și biologie. Natura genei și funcția sa în mecanismele genetice puteau fi acum privite și studiate din punct de vedere biochimic. Ca recunoaștere a muncii lor, alături de cea a lui Wilkins, celor trei li s-a acordat Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 1962. Din păcate, Rosalind Franklin murise în 1958, la vârsta de 37 de ani , ceea ce înseamnă că contribuțiile ei nu puteau fi luate în considerare, deoarece acest premiu nu putea fi acordat postum. Acest Premiu Nobel este unul dintre numeroasele acordate pentru muncă în domeniul geneticii moleculare .

10.8 Există forme alternative de ADN

În diferite condiții de izolare, au fost recunoscute mai multe forme conformaționale de ADN. Când Watson și Crick și-au efectuat analizele, erau cunoscute două forme de ADN - ADN-ul A și ADN -ul B. Analizele lui Watson și Crick s-au bazat pe studiile cu raze X ale formei B, prezentă în condiții apoase cu concentrație scăzută de sare și considerată a fi conformația importantă din punct de vedere biologic.

Deși studiile ADN din anii 1950 s-au bazat pe difracția de raze X, cercetări mai recente au utilizat difracția de raze X a monocristalelor. Studiile anterioare au atins o rezoluție de aproximativ 5 Å, în timp ce monocristalele difractă razele X la intervale de aproximativ 1 Å, ceea ce este aproape de rezoluția atomică. Drept urmare , fiecare atom este „ vizibil", rezultând detalii structurale mult mai mari.

Folosind această tehnică modernă, a fost analizat ADN-ul A, care este predominant în condiții de salinitate ridicată sau deshidratare . Comparativ cu ADN-ul B , ADN-ul A este puțin mai compact, cu 9 perechi de baze în fiecare rotație completă a helixului, rezultând un diametru de 23 Å (2,3 nm) (Figura 10.15). Deși este și dextrogyr, orientarea bazelor este oarecum diferită - acestea sunt înclinate și deplasate lateral față de axa helixului . Drept urmare , aspectul șanțurilor majore și minore este modificat. Pare îndoielnic că ADN-ul A apare *in vivo* (în condiții fiziologice).

de ADN dextrogir au fost descoperite în condiții de laborator și au fost denumite ADN-C, ADN-D și ADN-E, iar mai recent ADN-P. ADN- C se găsește în condiții de deshidratare chiar mai mari decât cele observate la izolarea ADN-ului A și ADN-B. Are doar 9,3 perechi de baze pe rotație și, prin urmare, este mai puțin compact. Diametrul helixului este de 19 Å. Ca și în ADN-A, ADN -C nu are perechi de baze dispuse orizontal; în schimb, acestea sunt înclinate față de axa helixului. Alte două forme, ADN-D și ADN- E , sunt produse în helixuri a căror compoziție de baze nu conține guanină. Acestea au și mai puține perechi de baze pe rotație: 8 și , respectiv, 7. Mai recent, cercetările efectuate de Jean-François Allemand și colaboratorii săi au arătat că , dacă ADN-ul este întins artificial , această moleculă ia o altă formă numită ADN-P (numită în memoria lui Linus Pauling). Comparativ cu forma B a ADN-ului, ADN-P este destul de interesant, deoarece este mai lung și...

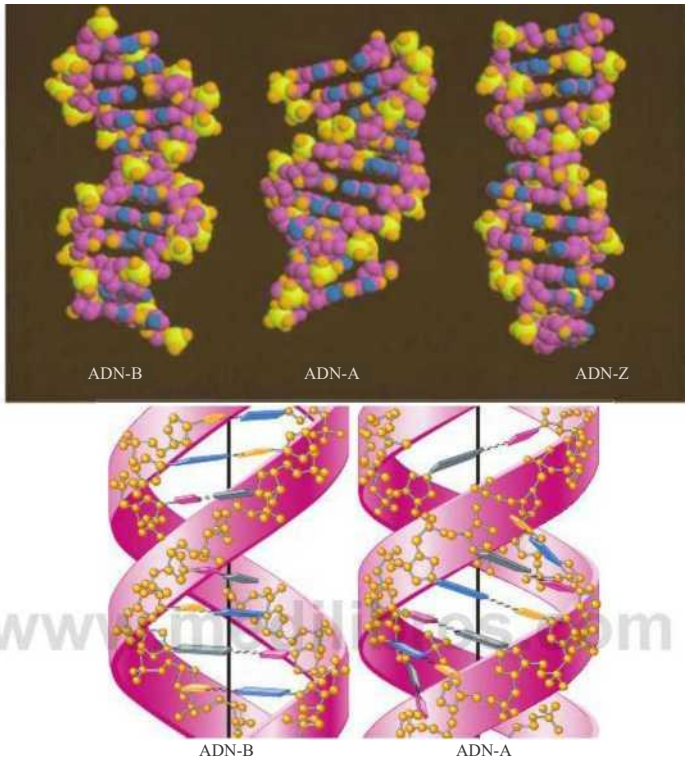


FIGURA 10.1 Jumătatea superioară a figurii prezintă modele generate pe computer ale ADN-B, ADN-A și ADN-Z. Sub fotografie este o reprezentare artistică care ilustrează orientarea perechilor de baze în ADN-B și ADN -A . Rețineți că perechile de baze din ADN-B sunt aranjate perpendicular pe helix, în timp ce în ADN -A sunt înclinate și decalate față de helix.

Grupările fosfat, care în ADN-B sunt situate la exterior, se găsesc în interiorul moleculei. Bazele azotate, care în ADN-B sunt situate în interiorul helixului, sunt situate în apropierea suprafeței exterioare a helixului în ADN-P, rezultând mai puține legături de hidrogen. Are 2,62 baze pe rotație , comparativ cu 10,4 în ADN-B.

În cele din urmă, o altă formă de ADN, numită ADN-Z, a fost descoperită de Andrew Wang, Alexander Rich și colaboratorii lor în 1979, în timp ce examinau un oligonucleotid ADN sintetic care conținea doar perechi de baze G = C. ADN-Z are configurația remarcabilă a unei *duble helixuri stângace* (Figura 10.15). La fel ca

ADN-A și ADN-B, ADN-Z constă din două catene antiparalele ținute împreună de perechi de baze Watson-Crick. În afară de aceste caracteristici, ADN-Z este destul de diferit. Helixul stângace are un diametru de 18 Å (1,8 nm), conține 12 perechi de baze pe rotație și adoptă o conformație în zig-zag (de unde și numele său). Șanțul major, prezent în ADN-B, este practic eliminat în ADN-Z. Există speculații actuale conform cărora regiunile ADN - Z există în cromozomii organismelor vii . Acest aranjament elicoidal caracteristic are potențialul de a oferi un situs important de recunoaștere pentru interacțiunea cu moleculele de legare a ADN - ului . Cu toate acestea , măsura în care ADN-Z apare in *vivo este* încă neclară .

Interesul pentru formele alternative de ADN, cum ar fi formele Z și P , provine din ideea că ADN-ul ar putea avea nevoie să adopte o altă structură decât forma B pentru unele dintre funcțiile sale genetice. Atât în timpul replicării , cât și al transcripției (când ARN-ul său complementar

este sintetizat în timpul expresiei genelor), lanțurile helixului trebuie să se separe și să devină accesibile enzimelor mari, precum și unei game largi de alte proteine implicate în aceste procese. Modificările formei ADN-ului pot facilita aceste funcții. Cu toate acestea, verificarea semnificației biologice a acestor forme alternative așteaptă încă cercetări suplimentare.

ACUM REZOLVĂ ASTA

10.2 În ADN-ul bicatenar al ariciului de mare, s-a constatat că 17,5% din baze sunt citozină (C). Ce procente din celelalte trei baze pot fi așteptate în acest ADN?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să extrapolăm dintr-o măsurătoare relativă la o anumită moleculă de ADN pentru a găsi celelalte trei valori care caracterizează molecula. Cheia rezolvării constă în înțelegerea regulilor de împerechere a bazelor din modelul Watson-Crick al ADN-ului.*

10.9

Structura ARN-ului este chimic similară cu cea a ADN-ului, dar monocatenară.

moleculelor de ARN este similară cu cea a ADN-ului, dar cu câteva excepții importante. Deși ARN-ul are , de asemenea, nucleotide legate în lanțuri polinucleotidice, riboza (zahărul) înlocuiește dezoxiriboza , iar baza azotată uracilul înlocuiește timina . O altă diferență importantă este că majoritatea ARN-ului este monocatenar, deși există două excepții importante. În primul rând, moleculele de ARN se pliază uneori înapoi pe ele însele pentru a forma regiuni dublu catenare cu perechi de baze complementare. În al doilea rând, unele virusuri animale care au ARN ca material genetic conțin spirale dublu catenare .

Așa cum am mai spus *(vezi* (Figura 10.1), există trei clase principale de molecule de ARN celular care funcționează în timpul exprimării informației genetice : ARN ribozomal (ARNr), ARN mesager (ARNm) și ARN de transfer (ARNt). Toate aceste molecule provin din copii complementare ale uneia dintre cele două catene de segmente de ADN în timpul procesului de transcripție. Adică , secvența lor nucleotidică este complementară secvenței dezoxiribonucleotidice a ADN - ului care servește drept șablon pentru sinteza lor. Deoarece uracilul înlocuiește timina în ARN , uracilul este complementar adeninei în timpul transcripției și în timpul împerecherii bazelor în ARN .

Tabelul 10.4 caracterizează principalele forme de ARN găsite în celulele procariote și eucariote . Diferitele ARN-uri se disting prin comportamentul lor de sedimentare într-un câmp centrifug și prin dimensiunea lor (numărul de nucleotide pe care le conține fiecare). Comportamentul de sedimentare depinde de densitatea , masa și forma moleculei , iar măsurarea sa se numește coeficientul Svedberg (5). Deși valorile mari de 5 desemnează aproape întotdeauna molecule cu greutate moleculară mare , corelația nu este directă ; adică o dublare a greutății moleculare nu duce neapărat la o dublare a lui S. Acest lucru se datorează faptului că , pe lângă masa moleculei, dimensiunea și forma acesteia afectează și rata de sedimentare (S). După cum se poate vedea în Tabelul 10.4, moleculele de ARN apar într-o gamă largă de dimensiuni .

ARN-ul ribozomal (ARNr) reprezintă de obicei aproximativ 80 % din ARN -ul total dintr -o celulă de E. coli . *ARNr este* o componentă structurală majoră a ribozomilor , care funcționează ca un banc de lucru nespecific unde proteinele sunt sintetizate în timpul traducerii . Diversele forme de ARNr găsite în organismele procariote și eucariote se diferențiază distinct prin dimensiunea lor .

TABLA 10.4 Principalele clase de ARN

Clase	% din ARN total*	Coeficientul Svedberg	Eucariot (E) sau procariot (P)	Număr de nucleotide
ARN ribosómico (ARNr)	80		Py E	120
		5,8	E	160
		16	P.	1.542
		18	E1.874	
		23 de ani	P.	2.904
		28 de ani	ȘI	4.718
ARN de transfer (ARNt)	15	4	Py E	75-90
ARN mesager (ARNm)	5	divers	Py E	100-10.000

* în £. *coli.*

Moleculele de ARN mesager transportă informații genetice de la ADN-ul genei la ribozom. Moleculele de ARNm variază considerabil în dimensiuni, reflectând gama de dimensiuni ale proteinelor codificate de ARNm, precum și diferitele dimensiuni ale genelor care servesc drept șabloane pentru transcripția ARNm. Deși tabelul 10.4 arată că în *E. coli* aproximativ 5 % din ARN este ARNm, acest procent variază de la celulă la celulă și chiar între - diferite momente din viața aceleiași celule.

ARN-ul de transfer (ARNt), care reprezintă până la 15% din ARN-ul dintr-o celulă tipică, este cea mai mică clasă (în ceea ce privește dimensiunea moleculară medie) dintre aceste molecule de ARN și este responsabilă pentru transportul aminoacizilor către ribozomi în timpul translației . Deoarece mai multe molecule de ARNt interacționează simultan cu ribozomul, această dimensiune mai mică a moleculei facilitează aceste interacțiuni.

În capitolele 13 și 14, vom discuta funcțiile acestor trei clase de ARN mult mai detaliat. Aceste tipuri de ARN reprezintă principalele forme ale moleculei implicate în exprimarea genelor, dar există și alte tipuri de ARN care îndeplinesc diverse funcții, în special la eucariote. De exemplu, ARN-ul telomerazic este implicat în replicarea ADN-ului la capetele cromozomilor (Capitolul 11), ARN-ul nuclear mic (snARN *)* participă la procesarea ARNm-urilor (Capitolul 13), iar ARN-ul antisens, microARN-ul (miARN) și ARN-ul scurt interferent (siARN *)* sunt implicate în reglarea genelor (Capitolul 17).

ACUM REZOLVĂ ASTA

10.3 Rubeola este rezultatul infecției cu virusul rubeolic , care poate cauza o multitudine de probleme de sănătate la nou-născuți . Ce concluzii putem trage dintr -o analiză a acidului nucleic care relevă un raport A + G/U + C de 1,13?

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm informații despre compoziția chimică a unui acid nucleic care servește drept material genetic al unui virus. Cheia rezolvării acesteia constă în aplicarea cunoștințelor noastre despre chimia acizilor nucleici și , în special, a conceptului de împerechere a bazelor.*

1 0,10

Multe tehnici analitice au fost utile în timpul cercetării ADN-ului și ARN-ului

material genetic și cea a ARN-ului în transcripție și traducere a fost clarificată prin analize detaliate ale acizilor nucleici.

În această secțiune, vom analiza câteva metode fundamentale care au fost deosebit de importante în efectuarea acestor analize . Multe dintre ele utilizează natura caracteristică a legăturii de hidrogen , care este atât de fundamentală pentru structura acizilor nucleici . În Capitolul 20, vom analiza tehnici suplimentare care au fost dezvoltate pentru a manipula ADN-ul în diverse moduri, inclusiv clonarea.

Absorbția luminii ultraviolete (UV)

Acizii nucleici prezintă o absorbție crescută a luminii ultraviolete (UV) la lungimi de undă între 254 și 260 nm (Figura 10.6) datorită interacțiunii dintre lumina UV și sistemele de inele purinice și pirimidinice. În soluție apoasă, vârful de absorbție pentru ADN și ARN apare la aproximativ 260 nm. Prin urmare, lumina ultravioletă poate fi utilizată pentru a localiza, izola și caracteriza moleculele care conțin baze azotate (de exemplu , nucleozide, nucleotide și polinucleotide).

Analiza ultravioletă este utilizată împreună cu multe alte proceduri standard care separă și identifică molecule . După cum vom vedea în secțiunea următoare, utilizarea absorbției UV este importantă pentru izolarea acizilor nucleici după ce aceștia au fost separați.

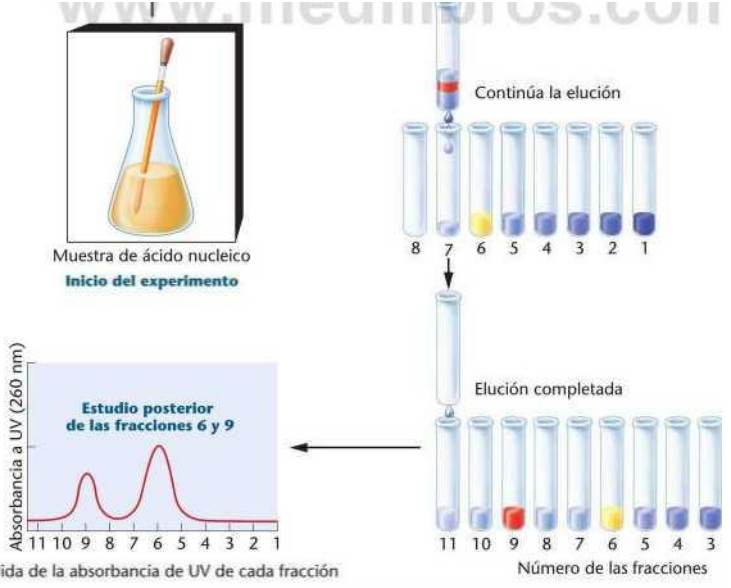
Comportamentul de sedimentare

Amestecurile de acizi nucleici pot fi separate în diferite componente prin supunerea lor la diverse proceduri de centrifugare (Figura 10.16). De exemplu, amestecul poate fi încărcat pe partea superioară a unei soluții preparate pentru a crea un gradient de concentrație între partea superioară și cea inferioară. Tubul care le conține pe ambele este apoi centrifugat la viteză mare folosind o ultracentrifugă. Aceasta determină migrarea moleculelor din amestec în josul gradientului de concentrație , fiecare tip de moleculă mișcându-se cu o viteză diferită . Odată ce centrifugarea s-a oprit, fracțiile succesive sunt eluate din tub , iar absorbanța lor la 260 nm este măsurată cu un spectrofotometru . Acest lucru permite determinarea poziției unei fracții de acid nucleic de-a lungul gradientului , iar acea fracție poate fi apoi izolată și studiată mai detaliat.

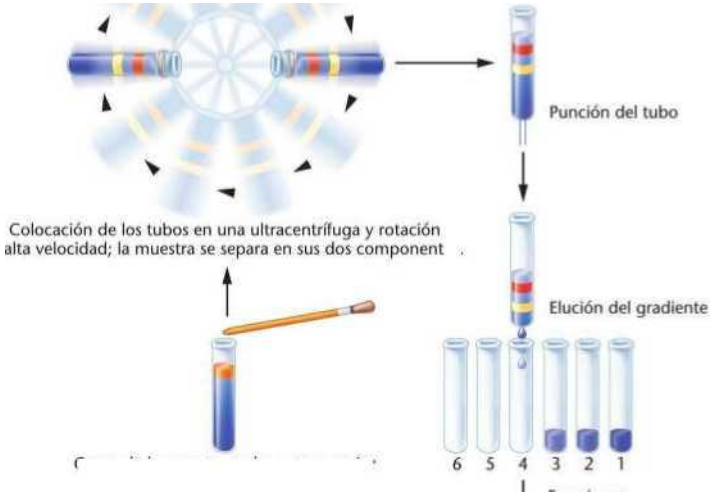
Acești gradienți de centrifugare se bazează pe comportamentul de sedimentare al moleculelor în soluție . Pentru analiza acidului nucleic , se utilizează două tipuri principale de tehnici de gradient de centrifugare : *echilibrul de sedimentare* și *viteza* de sedimentare . *Ambele* necesită utilizarea centrifugelor *de mare viteză* pentru a crea forțe centrifuge mari asupra moleculelor conținute într-o soluție cu gradient .

În centrifugarea de echilibru prin sedimentare (numită uneori centrifugare în gradient)

www.medilibros.com


Continúa la elución
8 7 6 5 4 3 2 1
Muestra de ácido nucleico
Inicio del experimento
Elución completada
11 10 9 8 7 6 5 4 3
Número de las fracciones
Estudio posterior
de las fracciones 6 y 9
Absorbancia a UV (260 nm)
11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
Medida de la absorbancia de UV de cada fracción

GURA 10.16 Separación de una mezcla de dos tipos de ácidos nucleicos mediante centrifugación por gradie
adiente, se van eluyendo sucesivamente muestras de la base del tubo. Se mide la absorbancia de luz ultraviolet
ıa de ellas, obteniéndose una gráfica con el perfil de la muestra.


Punción del tubo
Colocación de los tubos en una ultracentrífuga y rotación
alta velocidad; la muestra se separa en sus dos component
Elución del gradiente
6 5 4 3 2 1

Se creează un gradient de densitate care se suprapune cu densitățile componentelor individuale din amestecul de molecule. De obicei, gradientul se realizează cu o sare de metal greu, cum ar fi clorura de cesiu (CsCl). În timpul centrifugării, moleculele migrează până când ajung la un punct de densitate neutră de flotabilitate. În acest moment, forța centrifugă asupra lor este egală și opusă forței de difuzie ascendentă , astfel încât migrarea lor încetează. Dacă este prezent ADN cu densități diferite, acesta se va separa pe măsură ce moleculele fiecărei densități ating echilibrul cu densitatea corespunzătoare de CsCl. Gradientul poate fi apoi fracționat, iar componentele pot fi izolate (Figura 10.16). Dacă este efectuată corect, această tehnică oferă o rezoluție ridicată, permițând separarea amestecurilor de molecule ale căror densități variază doar ușor.

A doua tehnică, centrifugarea cu viteză de sedimentare , utilizează o centrifugă analitică, care folosește un sistem optic de absorbție a luminii ultraviolete pentru a monitoriza migrarea moleculelor în timpul centrifugării și a determina „viteza de sedimentare". După cum am menționat anterior, această viteză de sedimentare este măsurată în unități numite coeficienți Svedberg (S).

În această tehnică, moleculele sunt încărcate în partea superioară a gradientului, iar forțele gravitaționale create prin centrifugare le direcționează spre fundul tubului. Două forțe acționează împotriva acestei mișcări descendente: (1) rezistența la frecare creată de vâscozitatea soluției; și (2) o parte din forța de difuzie , care este îndreptată în sus. În aceste condiții, variabilele cheie sunt masa și forma moleculelor examinate. În general, cu cât masa este mai mare, cu atât rata de sedimentare este mai mare. Cu toate acestea, forma moleculei afectează rezistența la frecare . Prin urmare, două molecule cu masă egală, dar forme diferite, se vor sedimenta la viteze diferite .

Una dintre utilizările tehnicii vitezei de sedimentare este determinarea greutății *moleculare* (MW). Dacă se cunosc și anumite proprietăți fizico-chimice ale moleculei studiate, MW poate fi calculată pe baza vitezei de sedimentare. Așa cum am menționat anterior, valorile lui S cresc odată cu greutatea moleculară , dar nu sunt direct proporționale cu aceasta.

Denaturarea și renaturarea acizilor nucleici

Căldura și alți factori pot determina denaturarea unei molecule complexe precum ADN-ul , ceea ce înseamnă că își pierde funcția deoarece structura sa tridimensională se desface. Când ADN-ul bicatenar se denaturează , legăturile de hidrogen ale structurii duplex (bicatenare) se rup , helixul se desface, iar lanțurile se separă. Cu toate acestea, legăturile covalente rămân intacte . Vâscozitatea ADN -ului scade , iar atât absorbția UV, cât și flotabilitatea acestuia cresc. În studiile de laborator, denaturarea poate fi indusă intenționat prin încălzire sau tratament chimic. (Denaturarea termică este uneori numită *topire.)* În astfel de studii, creșterea absorbției UV la încălzirea unei soluții de ADN se numește variație hipercromă și este cea mai ușor de măsurat variație. Acest efect este ilustrat în Figura 10.17.

Deoarece perechile de baze G=C au o legătură de hidrogen în plus decât perechile A=T *(vezi* Figura 10.14), acestea sunt mai stabile la tratamentul termic. Astfel, ADN-ul cu o proporție mai mare de perechi G=C decât perechile A=T necesită temperaturi mai ridicate pentru a se denatura complet. Când absorbanța la 260 nm este monitorizată și reprezentată grafic în funcție de temperatura de încălzire, se obține profilul de topire al ADN-ului. Punctul de mijloc al acestui profil, sau curbă, se numește temperatura de topire (rm) și reprezintă punctul în care 50% din catene sunt desfăcute sau denaturate (Figura 10.17). Când curba se aplatizează la densitatea optică maximă, denaturarea este completă și rămân doar catene individuale . Analiza profilurilor de topire oferă caracterizarea ADN-ului și o metodă alternativă pentru estimarea compoziției sale în baze.

Este posibil să ne întrebăm dacă procesul de denaturare poate fi inversat; adică, pot lanțurile simple de acizi nucleici să reconstruiască o dublă spirală, presupunând că

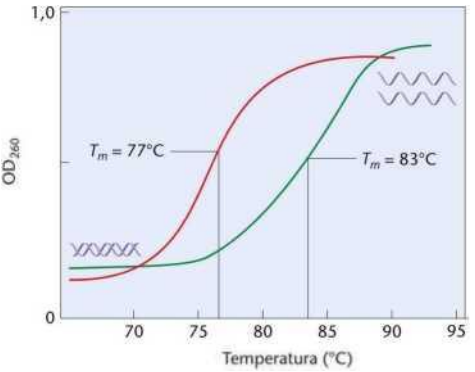


FIGURA 10.17 Profil de topire care arată creșterea absorbanței UV în funcție de temperatură (efect hipercromic) pentru două molecule de ADN cu conținut diferit de G=C. Molecula cu un punct de topire (T<sub> $_{M}$) de 83 °C are un conținut de G=C mai mare decât molecula cu o T _M de 77 °C.

Este prezentă fiecare catenă complementară? Nu numai că este așa, dar această reasociare oferă și baza pentru mai multe tehnici analitice importante care au contribuit cu informații valoroase în timpul experimentelor genetice.

Dacă ADN-ul denaturat termic este răcit lent, coliziunile aleatorii dintre catenele complementare vor duce la reasocierea lor. La temperatura corespunzătoare, legăturile de hidrogen se vor reforma, blocând perechile de catene în structuri duplex. Pe măsură ce răcirea continuă, se vor forma tot mai multe molecule duplex. În funcție de condiții, o potrivire perfectă (adică o complementaritate perfectă) nu este necesară pentru formarea unui duplex, atâta timp cât există regiuni de împerechere a bazelor între cele două catene care se reasociază.

Hibridizare moleculară

Denaturarea și renaturarea acizilor nucleici stau la baza uneia dintre cele mai puternice tehnici din genetica moleculară: hibridizarea moleculară. Această tehnică își datorează numele faptului că nu este nevoie ca niște catene simple să provină din aceeași sursă de acid nucleic pentru a forma structuri duplex. De exemplu, dacă lanțurile de ADN sunt izolate din două organisme diferite și există un grad rezonabil de complementaritate a bazelor între ele, în condiții de temperatură adecvate, în timpul renaturarii se vor forma hibrizi moleculari dublu catenari . O astfel de hibridizare ar putea apărea și între lanțuri simple de ADN și ARN. Un astfel de caz ar fi atunci când ARN-ul este unit cu ADN-ul din care a fost transcris (Figura 10.18).

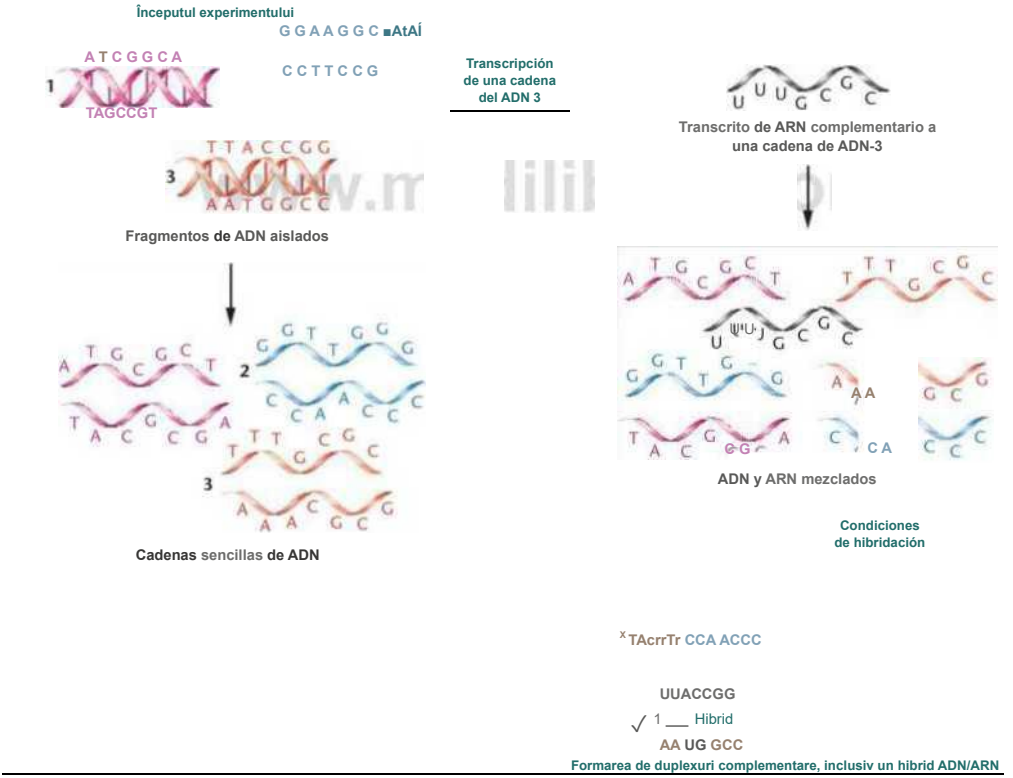


FIGURA 10.18 Reprezentare schematică a procesului de hibridizare moleculară dintre fragmentele de ADN și ARN-ul care a fost transcris dintr-o catenă a unuia dintre fragmentele de ADN.

ARN-ul își va găsi ADN-ul monocatenar complementar și se va lega de acesta. În acest exemplu, moleculele de ADN sunt încălzite, ceea ce le va determina să se separe, apoi răcite lent în prezența ARN-ului monocatenar. Dacă ARN-ul a fost transcris din ADN-ul utilizat în experiment și, prin urmare , este complementar acestuia, va avea loc hibridizarea moleculară, formând un duplex ADNiARN. Sunt disponibile mai multe metode pentru a urmări numărul de molecule dublu catenare produse după separarea catenelor. În studiile timpurii, s-au folosit radioizotopi pentru a „eticheta" una dintre catene și a monitoriza prezența acesteia în duplexurile hibride rezultate.

În anii 1960, tehnicile de hibridizare moleculară au contribuit la o mai bună înțelegere a fenomenelor transcripționale care au loc la nivel genetic. Rafinările continue ale acestui proces au dus la studii avansate atât asupra evoluției moleculare, cât și asupra organizării ADN -ului în cromozomi. Hibridizarea poate avea loc în soluție sau atunci când ADN-ul este legat de un gel sau de un filtru specializat de legare. Astfel de filtre sunt utilizate în diverse proceduri de transfer de ADN , unde hibridizarea acționează ca o „sondă" pentru secvențe complementare de acid nucleic. Transferul este utilizat în mod curent în analizele genomice moderne. În plus, hibridizarea va avea loc și atunci când ADN-ul face parte dintr-o probă de țesut plasată pe o lamă, ca în procedura FISH (discutată în secțiunea următoare) sau când se află pe un cip de sticlă, care stă la baza analizei microarray de ADN (discutată în Capitolul 24). Analiza microarray permite screening-ul în masă pentru a găsi o secvență specifică de ADN printre mii de gene clonate într-un singur test.

Hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH)

O rafinare a tehnicilor de hibridizare moleculară a condus la utilizarea ADN-ului prezent în preparatele citologice ca „țintă" pentru hibridizare. Atunci când această metodă este combinată cu utilizarea sondelor fluorescente, tehnica se numește hibridizare fluorescentă *in situ* sau, pur și simplu, FISH . În acest protocol, celulele mitotice sau în interfază sunt fixate pe o lamă și supuse condițiilor de hibridizare. Se adaugă ADN sau ARN monocatenar, iar hibridizarea este monitorizată. Acidul nucleic acționează ca o „sondă ", deoarece se va hibridiza doar cu regiunile specifice ale cromozomului față de care este suficient de complementar. Înainte de rafinarea sondelor fluorescente , în aceste proceduri *in situ* se utilizau sonde radioactive pentru a permite detectarea lor pe lamă prin autoradiografie.

Sondele fluorescente sunt preparate într -un mod destul de caracteristic . Atunci când se utilizează ADN, acesta este mai întâi legat de o moleculă organică mică numită biotină (creând ADN biotinilat). O altă moleculă (avidina sau streptavidina) care are o afinitate mare de legare pentru biotină este apoi legată de o moleculă fluorescentă, cum ar fi fluoresceina, iar acest complex reacționează apoi cu preparatul citologic după ce a avut loc hibridizarea in situ . Această procedură constituie o metodă extrem de sensibilă pentru localizarea ADN-ului hibridizat.

Figura 10.19 ilustrează rezultatele utilizării FISH pentru identificarea ADN-ului specific din centromerii cromozomilor umani. Rezoluția FISH este suficient de mare pentru a detecta o singură genă dintr-un set complet de cromozomi. Utilizarea acestei tehnici pentru identificarea locațiilor cromozomiale care adăpostesc informații genetice specifice a reprezentat o completare valoroasă a repertoriului geneticienilor experimentali .

Cinetica de reasociere și ADN-ul repetitiv

O extensie a protocoalelor de hibridizare moleculară este tehnica care măsoară catena *de reasociere.* de catene simple complementare de ADN. Această tehnică, numită cinetică de reasociere , a fost rafinată și studiată inițial de Roy Britten și David Kohne.

În aceste studii, ADN-ul utilizat este mai întâi fragmentat în bucăți mici prin aplicarea unor forțe de agitare în timpul izolării sale . Fragmentele de ADN

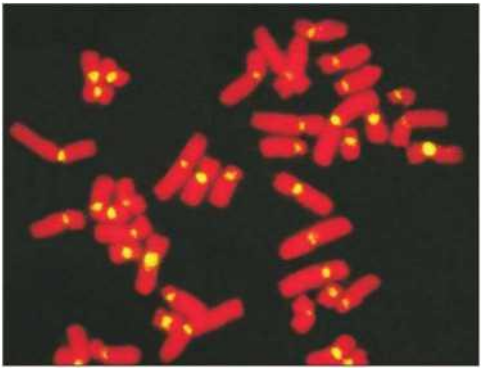


FIGURA 10.19 Hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH) a cromozomilor umani în metafază . Sonda , specifică pentru ADN-ul centromeric, produce un semnal fluorescent galben care indică hibridizarea. Fluorescența roșie este produsă prin contracolorarea ADN -ului cromozomial cu iodură de propidiu .

Fragmentele rezultate au o dimensiune medie de câteva sute de perechi de baze. Aceste fragmente sunt apoi separate (denaturate) prin căldură în catene simple, iar când temperatura este scăzută, procesul de reasociere este monitorizat. În timpul reasocierii, fragmentele de ADN monocatenar se ciocnesc aleatoriu. Dacă sunt complementare, se formează o catenă dublă stabilă ; dacă nu, se separă și sunt libere să găsească un alt fragment de ADN. Procesul continuă până când toate împerecherile au fost realizate .

O multitudine de informații pot fi obținute din studii care compară reasocierea ADN-ului din diferite organisme. Pe măsură ce dimensiunea genomului crește și este prezent mai mult ADN, timpul de reasociere încetinește . Reasocierea are loc mai lent în genomurile mai mari , deoarece coliziunile aleatorii necesită mai mult timp pentru ca toate împerecherile corecte să se producă. Când cinetica reasocierii a fost studiată pentru prima dată la organismele eucariote cu genomuri foarte mari, s-a făcut o observație surprinzătoare: în loc să necesite un timp de reasociere mai lung, *o parte* din ADN-ul eucariot s-a reasociat chiar mai rapid decât ADN-ul derivat din bacterii. ADN-ul rămas , așa cum era de așteptat datorită complexității sale , are nevoie de mai mult timp pentru a se reasocia.

Pe baza acestor observații, Britten și Kohne au emis ipoteza că fracția care se reasociază rapid trebuie să reprezinte secvențe de ADN repetitive. Această interpretare ar explica de ce aceste segmente se reasociază atât de repede - copii multiple ale aceleiași secvențe au o probabilitate mult mai mare de a se împerechea, reasociindu-se astfel mai rapid decât copiile individuale. Pe de altă parte, segmentele de ADN rămase erau compuse din secvențe de ADN unice, care sunt prezente o singură dată în genom.

Se știe acum că ADN-ul repetitiv predomină în genomurile eucariote și este esențial pentru înțelegerea modului în care informațiile genetice sunt organizate în cromozomi . Studii atente au arătat că există mai multe niveluri de repetiție. În unele cazuri, secvențele scurte de ADN sunt repetate de peste un milion de ori , în timp ce în altele, secvențele mai lungi sunt repetate doar de câteva ori, existând și niveluri intermediare de redundanță. Vom reveni la acest subiect în Capitolul 12 , unde vom discuta despre organizarea ADN-ului în gene și cromozomi. Deocamdată, vom observa pur și simplu că descoperirea ADN -ului repetitiv a fost unul dintre primele indicii că o mare parte din ADN-ul eucariot nu este conținut în genele care codifică proteine. Vom dezvolta și elabora acest concept pe măsură ce studiem baza moleculară a eredității.

Electroforeza acidului nucleic

Vom încheia acest capitol discutând electroforeza , o tehnică care a adus contribuții esențiale la analiza acizilor nucleici . Electroforeza, care este utilă și în studiile proteinelor, poate fi aplicată la separarea fragmentelor de ADN și ARN de diferite dimensiuni și este indispensabilă pentru cercetarea actuală în genetica moleculară.

În general, electroforeza separă sau *rezolvă* moleculele dintr-un amestec prin migrarea lor sub influența unui câmp electric . Proba care urmează a fi analizată este plasată pe o substanță poroasă (o bucată de hârtie de filtru sau un gel semisolidă), care este apoi plasată într-o soluție conductivă electric . Dacă două molecule au aproximativ aceeași formă și masă, cea cu o sarcină netă mai mare va migra mai rapid către electrodul de polaritate opusă.

Pe măsură ce tehnologia electroforetică s-a dezvoltat de la aplicarea sa inițială (separarea proteinelor), cercetătorii au descoperit că utilizarea gelurilor cu dimensiuni diferite ale porilor a îmbunătățit semnificativ rezoluția acestei metode . Acest progres a fost util în special pentru moleculele cu un raport sarcină-masă similar, dar cu dimensiuni diferite. De exemplu, două lanțuri polinucleotidice de lungimi diferite (de exemplu, 10 și 20 de nucleotide) sunt ambele încărcate negativ datorită grupării fosfat a nucleotidelor. Astfel, ambele lanțuri se deplasează spre polul pozitiv (anodul) și , deoarece au același raport sarcină-masă , câmpul electric le deplasează cu viteze similare . În consecință , separarea dintre cele două lanțuri este minimă . Cu toate acestea, utilizarea mediilor poroase , cum ar fi gelurile de poliacrilamidă sau agaroză, care pot fi preparate cu dimensiuni diferite ale porilor , ne permite să separăm cele două molecule. *Moleculele mai mici migrează prin gel cu o viteză mai mare decât cele mai mari* . (Figura 10.20). Cheia separării constă în matricea porilor gelului , care restricționează migrarea moleculelor mari mai mult decât a moleculelor mici . Puterea de rezoluție a acestei metode este atât de mare încât pot fi separate chiar și polinucleotidele care diferă doar cu un nucleotid în lungime . Odată ce electroforeza este completă , benzile care reprezintă moleculele de dimensiuni diferite sunt identificate prin autoradiografie (dacă una dintre componentele moleculei este radioactivă) sau prin utilizarea unui colorant fluorescent care se leagă de acizii nucleici .

electroforetică a acizilor nucleici este esențială pentru mai multe tehnici de cercetare utilizate în mod obișnuit , discutate mai târziu în acest text (Capitolele 20 și 21). De interes deosebit, așa cum vom vedea în aceste secțiuni, sunt diversele tehnici *de blotting* , cum ar fi *Southern* și *Western blotting* , precum și metodele de secvențiere a ADN-ului .

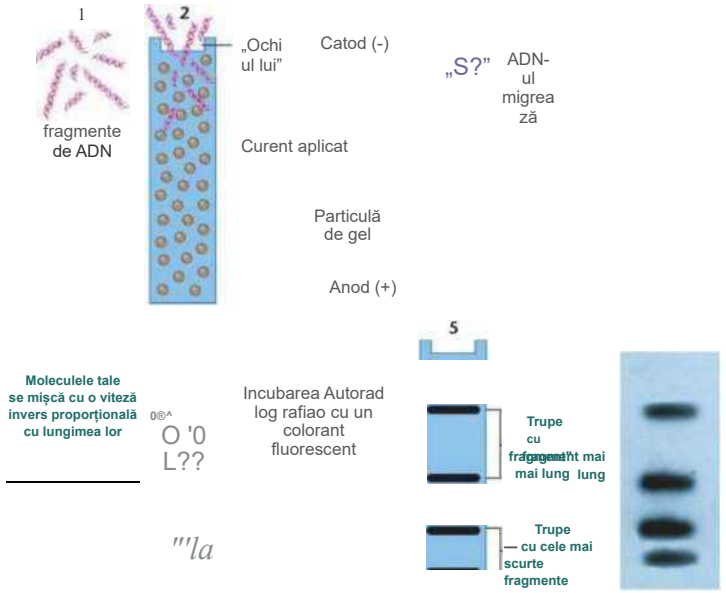


FIGURA 10.20 Separarea electroforetică a unui amestec de fragmente de ADN de diferite lungimi. Fotografia prezintă un gel de agaroză cu benzi de ADN.

EXPLORARE
DE GENOMICĂ

Introducere către bioinformatică: BLAST

■ MG Aree de *estudio. Exploración* de *la G&iómka.*

ŞI În acest capitol, ne-am concentrat asupra detaliilor structurale ale ADN-ului, elementul constitutiv al organismelor vii. În Capitolul 20, vom vedea cum oamenii de știință pot clona și secvența ADN-ul - o tehnică de rutină în laboratoarele de biologie moleculară și genetică. Explozia datelor despre secvențele de ADN și proteine din ultimii 15 ani a alimentat dezvoltarea bioinformaticii , o știință interdisciplinară care aplică matematica și informatica pentru a dezvolta hardware și software pentru stocarea, partajarea, compararea și analizarea datelor despre secvențele de acizi nucleici și proteine.

Au fost dezvoltate numeroase baze de date de secvențe care utilizează bioinformatica. Un exemplu este GenBank { www.ncbi.nlm.nrh.gov/Genbank/index.html } , care este baza de date de secvențe a *Institutelor* Naționale *de Sănătate.* Această resursă globală, cu acces la baze de date din Europa și Japonia, conține în prezent peste 148.000 de milioane de perechi de baze de date de secvențe .

secțiunea „ Experimentarea genomicii” din Capitolul 5, am prezentat site-ul web Genes

and Disease de la Centrul Național *pentru Informații Biotehnologice (* NCBI). Acum vom folosi o aplicație NCBI numită BLAST, Basic Local Alignment Search Tool. BLAST este un program esențial pentru căutarea în GenBank și în alte baze de date pentru a găsi similarități în secvențele de ADN sau proteine dintre substanțele clonate. De asemenea, are multe alte funcții suplimentare pe care le vom explora în alte exerciții.

■ **Exercițiul I. Introducere în BLAST**

1. Accesați BLAST de pe site-ul NCBI la adresa http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
2. Faceți clic pe *nucleotide blast.* Această funcție ne permite să căutăm în bazele de date ADN pentru a localiza asemănări între o secvență introdusă și alte secvențe incluse în baza de date. Efectuați o căutare de nucleotide cu următoarea secvență:

   CCAGATCCAGCTGCTGCT CATA
   CTACTGATACTGCTGGG

3. Imaginați-vă că această secvență este o mică parte a unei gene pe care am clonat-o în laboratorul nostru. Vrem să știm dacă această genă sau altele cu secvențe similare au fost deja descoperite. Introduceți această secvență în caseta text *Introduceți secvența de interogare* din partea de sus a paginii. În partea de jos, sub *categoria Selecție program,* selectați - „blastn"; apoi faceți clic pe butonul BLAST din partea de jos a paginii pentru a rula căutarea. Obținerea rezultatelor poate dura câteva minute, deoarece BLAST utilizează algoritmi puternici pentru a căuta miliarde de puncte de date despre secvențele de bază. Va apărea o pagină nouă cu rezultatele căutării .
4. În partea de sus a acestei pagini, veți vedea un tabel care prezintă potriviri semnificative cu secvența căutată (secvența de interogare). BLAST determină semnificația potrivirilor pe baza unor măsuri statistice care iau în - considerare lungimea secvenței de interogare , numărul de potriviri cu secvențele stocate în baza de date și alți factori. Alinierile semnificative - adică regiunile cu o lungime semnificativă între șirul de interogare și secvențele din baza de date - au *de obicei* valori E mai mici de 1,0 .
5. Partea de sus a tabelului arată potrivirile cu transcrierile (secvențele ARNm), în timp ce partea de jos arată potrivirile cu - secvențele de ADN genomic , ordonate de la cel mai mare la cel mai mic număr de potriviri . Utilizați coloana Linkuri , situată în extrema dreaptă a acestui tabel, pentru a explora bazele de date de gene și cromozomi relevante pentru secvențele localizate .
6. Alinierile sunt indicate prin linii orizontale. BLAST ajustează datele pentru a ține cont de lacunele din secvențe - adică zonele care s-ar putea să nu se alinieze precis deoarece bazele lipsesc în secvențe altfel similare . Derulați în jos în tabel pentru a vedea secvențele aliniate pentru această căutare , apoi răspundeți la următoarele întrebări:

   (a) Care au fost cele trei coincidențe principale cu secvența noastră de căutare ?
   (b) Pentru fiecare aliniere, BLAST indică, de asemenea, procentul de identitate și numărul de lacune în corespondența dintre secvența *interogată și* cele din baza de date (prezentate în coloana de sub titlul Max ident) . *Care* este procentul de identitate pentru cele trei - corespondențe principale? Ce procent din fiecare secvență aliniată prezintă lacune care indică diferențe între secvențe ?

   (c) Faceți clic pe linkurile corespunzătoare primei secvențe localizate (în coloana din dreapta). Aceasta vă va oferi acces la o multitudine de informații, inclusiv dimensiunea secvenței ; specia din care derivă; o cronologie cu linkuri PubMed către articole de cercetare legate de această secvență ; secvența completă; și , dacă secvența codifică un polipeptid, secvența de aminoacizi despre care se preconizează că este codificată de genă. Aruncați o privire la informațiile prezentate pentru această genă. Care este funcția acestei gene?
7. De asemenea, puteți efectua o căutare BLAST introducând numărul de acces al unei secvențe , care este un identificator unic atribuit fiecărei secvențe înainte de a fi introdusă într-o bază de date. De exemplu, încercați să căutați cu numărul de acces NM_007305. Ce ați găsit?
8. Efectuați o căutare în BLAST utilizând secvențele sau numerele de acces - enumerate mai jos. În fiecare caz, după introducerea numărului sau a secvenței de acces în caseta *Introducere secvență de interogare ,* accesați caseta *Alegeți setul de căutare* și faceți clic pe butonul *Altele* . Pentru a selecta baza de date, accesați caseta *Selecție program* și faceți clic pe *megablast* înainte de a rula căutarea. Aceste funcții vă vor permite să aliniați secvența de interogare cu gene similare de la diverse alte specii. După finalizarea fiecărei căutări, explorați informațiile furnizate de BLAST pentru a identifica gena codificată de secvență și a afla mai multe despre aceasta.

   (a) NM_001006650. Care este secvența principală care se aliniază cu secvența de interogare a acestui număr de acces și prezintă o identitate de secvență de 100% ?
   (b) DQ991619. Ce genă este codificată de această secvență?
   (c) NC_007596. Care animal are o secvență similară cu aceasta?

STUDIU DE CAZ | Câteva informații despre virusul variolei

Variola, o boală odinioară extrem de letală și contagioasă , a fost eradicată la nivel mondial . Cu toate acestea , cercetările continuă asupra probelor stocate de variolă , virusul variolei, deoarece este o potențială armă bioteroristă. Celulele umane se protejează de virusul variolei (și de alte virusuri) prin activarea genelor care codifică proteine protectoare. Recent s-a descoperit că, în răspuns la virusul variolei, celulele umane creează fragmente mici, tranzitorii de ADN Z la nivelul locurilor care reglează aceste gene. Virusul variolei poate ocoli acest mecanism de apărare celulară prin țintirea specifică a segmentelor de ADN Z și inhibarea sintezei proteinelor protectoare. Această descoperire ridică câteva întrebări interesante:

1. Ce este atât de special la ADN-ul Z care îl face o țintă specifică în timpul infecției virale ?
2. Cum poate virusul să atace formarea ADN - ului Z în celula gazdă, pentru a bloca sinteza proteinelor antivirale ?
3. Pentru a studia interacțiunea dintre proteinele virale și ADN - Z , cum ar putea fi sintetizat în laborator ADN-ul capabil să formeze ADN-Z ?
4. Cum ar putea duce această cercetare la dezvoltarea de medicamente pentru combaterea infecției cu variolă și a altor virusuri înrudite?

Puntos de resumen

Pentru a vizualiza activități, animații și întrebări de recapitulare, consultați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

1. Deși atât proteinele, cât și acizii nucleici au fost inițial considerați posibili candidați pentru formarea materialului genetic, cercetătorii au favorizat inițial proteinele.
2. În 1952, studiile și experimentele de transformare efectuate pe bacterii infectate de bacteriofagi au sugerat cu tărie că ADN-ul este materialul genetic al bacteriilor și al majorității virusurilor.
3. Deși inițial doar observațiile indirecte au susținut ipoteza că ADN-ul controlează moștenirea la eucariote, studii ulterioare care au utilizat tehnici de ADN recombinant și șoareci transgenici au furnizat dovezi experimentale directe că ADN-ul este materialul genetic la eucariote.
4. ARN-ul servește drept material genetic în unele bacteriofage, precum și în unele virusuri care afectează plantele și animalele.
5. Așa cum au propus Watson și Crick, ADN-ul are forma unei duble spirale dextrogice, compusă din două lanțuri polinucleotidice antiparalele lungi , ținute împreună prin legături de hidrogen formate între perechi de baze azotate complementare .
6. A doua categorie importantă de acizi nucleici , prin funcția lor genetică, este ARN-ul, care este similar cu ADN-ul, cu excepția faptului că este de obicei monocatenar, riboza (zahărul) înlocuiește dezoxiriboza, iar uracilul (pirimidina) înlocuiește timina .
7. Diverse metode de analiză a acizilor nucleici, în special hibridizarea moleculară și electroforeza , au permis realizarea de studii esențiale pentru înțelegerea mecanismelor genetice.
8. Printre tehnicile utilizate pentru studierea ADN-ului bicatenar , analiza cineticii de reasociere a permis geneticienilor să postuleze existența ADN-ului repetitiv la eucariote , adică faptul că există anumite secvențe de nucleotide prezente de mai multe ori în genom.

IDEI ȘI SOLUȚII

Spre deosebire de capitolele anterioare, acest capitol nu se concentrează pe rezolvarea problemelor genetice. În schimb , trece în revistă unele dintre analizele experimentale timpurii care au format piatra de temelie a geneticii moderne. Prin urmare , secțiunea „ Idei și soluții" pune accentul pe gândirea rațională și analitică, o abordare pe care o vom continua să o folosim în capitolele ulterioare, acolo unde este cazul.

1. a) Pe baza strictă a datelor din analiza transformării realizată de Avery, MacLeod și McCarthy, ce obiecție s-ar putea face la concluzia că ADN-ul este materialul genetic? Ce alte concluzii ar putea fi luate în considerare? (b) Ce observații, inclusiv cele făcute ulterior, permit respingerea acestei obiecții?

   Soluție, (a) Pe baza exclusivă a rezultatelor lor , s-ar putea concluziona că ADN-ul este esențial pentru transformare. Cu toate acestea , ADN-ul ar fi putut fi o substanță care a cauzat formarea capsulei prin transformarea *directă* a celulelor necapsulate în celule încapsulate. Adică , ADN-ul ar fi putut pur și simplu juca un rol catalitic în sinteza capsulei , determinând celulele să prezinte colonii netede de tip III.

(b) În primul rând, celulele transformate au transmis trăsătura celulelor fiice , susținând astfel concluzia că ADN-ul este responsabil pentru ereditate și nu pentru producerea directă a învelișurilor de polizaharide. În al doilea rând, studiile ulterioare de transformare, efectuate pe o perioadă de cinci ani, au arătat că alte trăsături, cum ar fi rezistența la antibiotice , ar putea fi transformate . Prin urmare , factorul de transformare are un efect general , larg , nu unul specific sintezei polizaharidelor . Această

observație este în concordanță cu concluzia că ADN-ul este materialul genetic .

2. Dacă ARN-ul ar fi fost materialul genetic universal, cum ar fi afectat experimentele Avery și Hershey -Chase ?

   Soluție. În experimentul lui Avery , digestia filtratului solubil cu RNază în loc de DNază ar fi eliminat transformarea. Dacă s-ar fi întâmplat acest lucru, Avery și colaboratorii săi ar fi ajuns la concluzia că ARN-ul era factorul de transformare. Hershey și Chase ar fi obținut rezultate identice, deoarece ^{32P} ar fi marcat și ARN-ul, dar nu și proteina. Dacă ar fi folosit un bacteriofag cu ARN ca acid nucleic și dacă ar fi știut acest lucru, ar fi ajuns la concluzia că ARN-ul era responsabil pentru dirijarea reproducerii bacteriofagilor lor.

3. Căutarea izolării organismului care cauzează o boală majoră a avut succes, iar biologii moleculari au făcut o treabă excelentă analizând rezultatele. Organismul conținea, ca material genetic, un acid nucleic cu următoarea compoziție de baze: A = 21%, C = 29 %, G = 29% și U = 21 %. Când a fost încălzit, a prezentat un efect hipercromic semnificativ, iar când a fost studiată cinetica sa de reasociere, acidul nucleic al acestui organism s-a reasociat mai lent decât cel al fagului 1, 4 și E. *coli.* T4 conține 10 perechi de nucleotide.

   Analizați cu atenție aceste informații și propuneți *toate concluziile* posibile despre materialul genetic al acestui organism, bazate strict pe aceste observații. Ca dovadă pentru modelul dumneavoastră, faceți o predicție care, dacă s-ar îndeplini, ar consolida ipoteza dumneavoastră despre natura acestei molecule.

   Soluție. În primul rând, datorită prezenței uracilului (U), molecula pare a fi ARN. Spre deosebire de ARN-ul normal, raportul bazelor din această moleculă este A/U = G/C = 1, ceea ce sugerează că molecula ar putea fi o dublă helix. Variația hipercromă și cinetica reasocierii susțin această ipoteză. În studiul cinetic, deoarece niciunul dintre segmentele de acid nucleic nu s-a reasociat mai rapid decât acidul nucleic bacterian sau viral, putem deduce că nu există ARN cu secvențe repetitive. În plus, lungimea totală a ADN-ului cu secvență unică este mai mare decât cea a fagului T4 (perechi de nucleotide 10') sau *a E. coli.* S-ar putea face o predicție cu privire la zaharuri . Modelul nostru sugerează că ar trebui să existe riboză în loc de dezoxiriboză. Dacă da, această observație ar susține ipoteza că ARN-ul este materialul genetic al acestui organism.

Probleme și întrebări pentru discuții

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com

DE CUM ȘTIM?

1. În acest capitol, ne-am concentrat mai întâi pe informațiile care demonstrează că ADN-ul este materialul genetic și apoi am explicat structura ADN -ului așa cum a fost propusă de Watson și Crick. Am încheiat capitolul prin descrierea mai multor tehnici dezvoltate pentru studierea ADN-ului. Pe parcursul procesului, am întâlnit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care au permis dobândirea unei mari părți din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol, ce răspunsuri ați propune la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum au reușit oamenii de știință să determine că ADN-ul, și nu o altă moleculă, acționează ca material genetic în bacterii și bacteriofagi?
   (b) De unde știm că ADN-ul acționează și ca material genetic în organismele eucariote, cum ar fi oamenii?
   (c) Cum s-a stabilit că structura ADN-ului este o dublă spirală în care cele două lanțuri sunt ținute împreună prin legături de hidrogen formate între baze azotate complementare ?
   (d) De unde știm că G se împerechează cu C și că A se formează cu T ca perechi de baze complementare ?
   (e) De unde știm că există secvențe repetitive de ADN în organismele eucariote?
4. Comparați diversele contribuții aduse de Griffith, Avery și colaboratorii săi, precum și de Taylor la înțelegerea transformării .
5. Când Avery și colaboratorii săi au obținut ceea ce s -a concluzionat a fi factorul de transformare al celulelor IIIS virulente , au tratat proba cu proteaze, RNază și DNază, efectuând ulterior testele necesare în fiecare caz pentru a determina dacă capacitatea de transformare a fost păstrată sau pierdută. Care au fost obiectivele și rezultatele acestor experimente ? Ce concluzii s-au tras?
6. De ce a fost[11] Ce au fost ^{12}P și ^{J5}S în experimentul Hershey-Chase? Discutați logica și concluziile acestui experiment.
7. Designul experimentului Hershey-Chase distinge între ADN și ARN ca moleculă care servește drept material genetic ? De ce sau de ce nu?
8. Care observații sunt în concordanță cu concluzia că ADN-ul servește drept material genetic în organismele eucariote? Enumerați-le și discutați-le.
9. Care sunt excepțiile de la regula generală conform căreia ADN-ul este materialul genetic al tuturor organismelor? Ce dovezi susțin aceste excepții?
10. Desenați structura chimică a celor trei componente ale unui nucleotid și uniți - le . Care atomi sunt îndepărtați din structuri atunci când se formează legăturile?
11. Cum sunt enumerați atomii de carbon și azot ai zaharurilor, purinelor și pirimidinelor?
12. Adenina poate fi denumită și 6-aminopurină. Cum ați denumi celelalte patru baze azotate folosind acest sistem alternativ ? (O este oxi, iar CH este metil).
13. Desenați structura chimică a unei dinucleotide formate din A și G. În direcția opusă acestei structuri, desenați dinucleotida compusă

11 Funcțiile atribuite materialului genetic sunt replicarea , exprimarea, stocarea și mutația. Ce înseamnă fiecare dintre acești termeni în contextul geneticii?
12 Discutați motivele pentru care, înainte de 1940, proteinele erau preferate ADN-ului ca material genetic. Ce rol a jucat ipoteza tetranucleotidelor în această controversă?

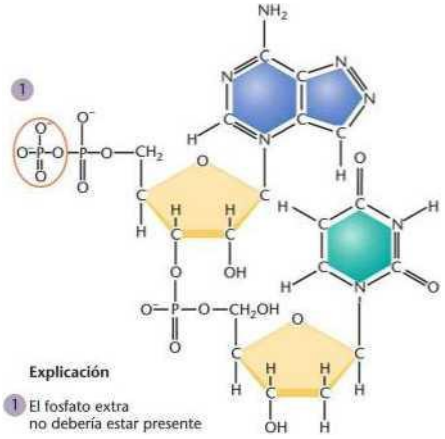
din T și C într-o direcție antiparalelă (sau inversată). Desenați orice legături de hidrogen.

14. Descrieți diferitele caracteristici ale modelului de dublă helix Watson-Crick al ADN-ului
15. Ce dovezi aveau Watson și Crick în 1953? Care a fost abordarea lor pentru determinarea structurii ADN -ului?
16. Dacă datele lui Chargaff obținute dintr-o singură sursă ar fi fost cele din tabelul următor, ce concluzie ar fi putut trage Watson și Crick?

	LA	T.	G.	C.
%	29	19	21 de ani	31 de ani

De ce ar contrazice această concluzie datele obținute de Wilkins și Franklin?

17. Prin ce diferă legăturile covalente de legăturile de hidrogen ? Definiți conceptul de complementaritate a bazelor .
18. Enumerați cele mai importante trei diferențe dintre ADN și ARN.
19. Care sunt cele trei tipuri principale de molecule de ARN ? Cum se leagă fiecare dintre ele de conceptul de flux informațional?
20. Care componentă a nucleotidelor este responsabilă pentru absorbția -luminii ultraviolete ? De ce este importantă această tehnică pentru analiza acidului nucleic ?
21. Distingeți între centrifugarea cu rata de sedimentare și centrifugarea la echilibru de sedimentare (centrifugarea cu gradient de densitate).
22. Care este starea fizică a ADN-ului după denaturare ?
23. Ce este efectul hipercromic? Cum se măsoară? Ce implică T_w ?
24. De ce este *T_m* legată de compoziția bazei?
25. Care este baza chimică a hibridizării moleculare ?
26. Ce sugerează modelul Watson-Crick despre replicarea ADN-ului ?
27. Unui student la genetică i s-a cerut să deseneze structura chimică a unui dinucleotid derivat din ADN, care conține adenină și timină . Răspunsul său este prezentat la sfârșitul coloanei anterioare .



Elevul a făcut mai mult de șase greșeli majore. Una dintre ele este încercuită și numerotată cu 1 , iar motivul erorii este explicat . Găsiți celelalte cinci erori, încercuiți-le, numerotați-le de la 2 la 6 și explicați pe scurt fiecare eroare într-un mod similar cu exemplul furnizat.

28. Având în vedere informațiile din acest capitol despre ADN-B și ADN-Z, precum și despre helixurile dextrogice și legomice, analizați cu atenție următoarele structuri și trageți concluzii despre natura elicoidală a structurilor (a) și (b). Care este dextrogică și care este legomică?

29. Una dintre cele mai frecvente leziuni spontane ale ADN-ului în condiții fiziologice este hidroliza grupării amino a citozinelor , transformându -le în uracil. Care va fi efectul asupra structurii ADN-ului dacă o grupare uracil înlocuiește o citozină ?
30. La unele organisme, citozina este metilată la atomul de carbon 5 al inelului pirimidinic după ce este încorporată în ADN. Dacă o moleculă de 5 -metilcitozină este apoi hidrolizată , așa cum este descris în Problema 29, ce bază va fi generată?
31. Datorită timpului său de răspuns rapid , hibridizarea fluorescentă *in situ (FISH) este* utilizată în mod obișnuit în spitale și laboratoare pentru a detecta celulele aneuploide printre celulele prelevate în timpul amniocentezei sau prelevării de vilozități coriale (CVS). Cromozomii 13, 18, 21, X și Y sunt de obicei analizați pentru aneuploidii folosind această tehnică *(vezi* Capitolul 8). Explicați cum se poate efectua un test FISH folosind probe amniotice sau CVS și de ce au fost aleși acești cromozomi pentru analiză .
32. Să presupunem că suntem interesați să separăm molecule scurte de ADN (între 25 și 40 de nucleotide) dintr-un set de molecule mai mari , în intervalul 900 - 1.000 de nucleotide. Avem două rețete pentru prepararea gelurilor noastre de poliacrilamidă : una folosește 12% acrilamidă și ar fi considerată un „ gel dur ”, în timp ce cealaltă folosește 4 % acrilamidă și ar fi considerată un gel moale . Ce rețetă ați folosi și de ce?

Problemas extrapicantes

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

33 A fost descoperit un organism eucariot primitiv care prezenta un acid nucleic ciudat ca material genetic. Analiza acestuia a relevat următoarele observații.

(a) Studiile de difracție cu raze X arată un model similar cu cel al ADN-ului, dar cu unele dimensiuni diferite și mai neregulate.

(b) O variație hipercromică semnificativă se observă după încălzire și detectarea absorbției UV la 260 nm.

(c) Analiza compoziției bazelor arată patru baze în următoarele proporții:

Adenină	8%
Guanină	37%
Xantină	37%
Hipoxantină	18%

(d) Aproximativ 75 % dintre zaharuri sunt dezoxiriboze, în timp ce 25 % sunt riboze.

Încercați să rezolvați structura acestei molecule postulând un model care este în concordanță cu observațiile anterioare.

34. *Actualizare știri: 1 martie 2030. O* creatură ciudată a fost descoperită în timpul explorării spațiului cosmic. Recent, materialul său genetic a fost izolat și analizat . Acest material este similar cu ADN-ul în anumite aspecte, în special în ceea ce privește compoziția sa chimică . Conține cantități abundente de eritroză, un zahăr cu 4 atomi de carbon , și un echivalent molar de grupări fosfat . În plus, conține șase baze azotate: adenină (A), guanină (G), timină (T), citozină (C), hipoxantină (H) și xantină (X). Aceste baze sunt prezente în următoarele proporții relative :

A = T = H și C = G = X

Studiile de difracție cu raze X au stabilit că molecula este regulată și are un diametru constant de aproximativ 30 Å . Luate împreună, aceste date sugerează un model pentru structura acestei molecule.

(a) Propuneți un model general al acestei molecule. Descrieți-l pe scurt.

(b) Ce proprietăți de împerechere a bazelor trebuie să existe pentru H și pentru X în model ?

(c) Având în vedere diametrul constant de 30 Å, credeți că *fie (i) atât* H, cât și X sunt purine sau ambele pirimidine, *fie* (ii) una este o purină, iar cealaltă este o pirimidină?

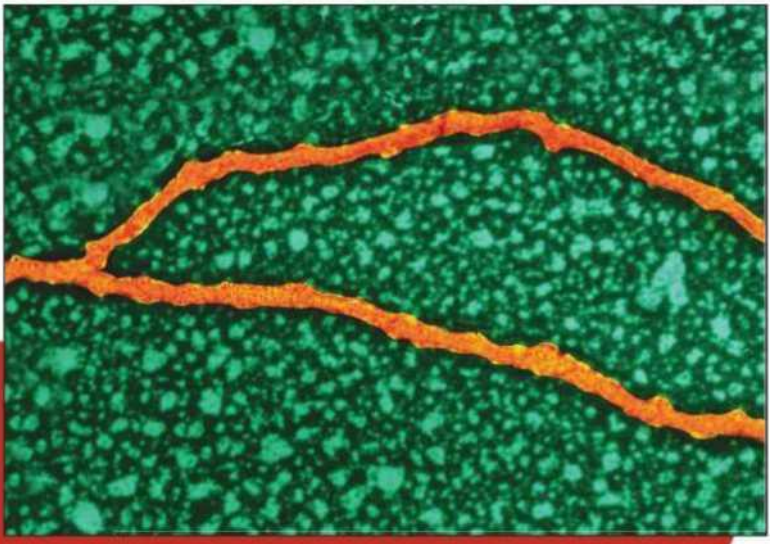
35. Vi se oferă mostre de ADN de la două virusuri bacteriene recent descoperite . Pe baza diferitelor tehnici analitice discutate în acest capitol, concepeți un protocol de cercetare pentru a caracteriza și compara ADN-ul ambelor virusuri . Indicați ce fel de informații vă așteptați să obțineți din fiecare dintre tehnicile incluse în protocol .

36. În timpul electroforezei în gel, moleculele de ADN pot fi ușor separate în funcție de dimensiune, deoarece toate au același raport sarcină -masă și aceeași formă (ca o tijă alungită). Vă așteptați ca moleculele de ARN să se comporte la fel ca moleculele de ADN în timpul electroforezei în gel ? De ce sau de ce nu?

37 Electroforeza este o procedură extrem de utilă atunci când este aplicată analizei acizilor nucleici, deoarece permite rezoluția (diferențierea) moleculelor de dimensiuni diferite cu relativă ușurință și precizie ridicată . Moleculele mari migrează mai lent decât cele mici în geluri de agaroză și poliacrilamidă . Cu toate acestea, faptul că acizii nucleici de aceeași lungime pot exista într-o mare varietate de conformații poate complica adesea interpretarea separărilor electroforetice. De exemplu, atunci când o singură specie de plasmidă bacteriană este izolată din celule, plasmidele individuale pot exista în trei forme distincte (în funcție de genotipul gazdei și de condițiile de izolare): superelicoidală/superspirală (forma I), circulară crestată/deschisă (forma II) și liniară (forma III). Forma I este compactă și foarte strâns înfășurată, ambele catene de ADN fiind continue. Forma II are un aspect aproximativ circular deoarece una dintre cele două catene de ADN s-a rupt, eliberând astfel superînfășurarea. Toate trei au aceeași masă, dar fiecare va migra cu o viteză diferită printr -un gel. Având în vedere ceea ce știți despre compoziția gelului și migrarea ADN-ului , preziceți ratele relative de migrare ale diferitelor structuri de ADN menționate.

38 Următorul tabel (modificat după Kropinski, 1973) prezintă T <*sub*> *m</sub>* și compoziția chimică (%G=C) a ADN-ului anumitor bacteriofagi . Din aceste date, construiți un grafic care să arate %G=C (ordonată) și *T_{m*} (axial). Care este relația dintre *T* _{*m*} și %G =C pentru aceste probe? Care ar putea fi baza moleculară a acestei relații?

Fag		%G = C
la	86,5	44,0
K.	91,5	53,8
4	89	49.2
d>80	90,5	53,0
X	92.1	57,4
Mu-1	88	51,4
TU	89	48,0
T3	90	49,6
T7	89,5	48,0



Micrografía electrónica de transmisión de ADN humano de una célula HeLa, mostrando una horquilla de replicación característica de ADN en replicación activa

11

Replicarea și recombinarea ADN-ului

CONCEPTE CAPITOL

Continuitatea genetică dintre celulele - **mamă** și descendenții **acestora este** menținută prin replicarea semiconservativă a ADN-ului , **așa cum este prezis de modelul Watson-Crick** .

►► **În replicarea semiconservativă** , fiecare catenă a dublei helixuri parentale servește drept șablon **pentru** producerea catenei **sale** complementare, **iar fiecare** dublă helix rezultată **include** o catenă de ADN „veche" **și o** catenă de ADN „nouă".

Sinteza ADN-ului este un proces complex **și** ordonat , care are loc sub conducerea unei **multitudini de enzime și alte proteine** .

Sinteza **ADN-ului implică polimerizarea** nucleotidelor **în** lanțuri polinucleotidice .

Sinteza ADN-ului este similară la organismele procariote **și eucariote** ,

deși este mai complexă la acestea din urmă.

eucariote , sinteza ADN-ului la capetele cromozomilor (telomeri) pune o problemă specială, care este rezolvată de o enzimă specifică care conține ARN , telomeraza.

►► Recombinarea genetică, un proces important care duce la schimbul de segmente între moleculele de ADN , are loc sub conducerea unui grup de enzime.

T. Urmând propunerea lui Watson și Crick privind - structura ADN-ului, oamenii de știință și-au concentrat atenția asupra modului în care se replică această moleculă. Replicarea este o funcție esențială a materialului genetic și trebuie executată cu precizie dacă, după diviziunea celulară, se dorește menținerea continuității genetice între celule. Este o sarcină enormă și complexă. Luați în considerare pentru o clipă că există mai mult de 3 x 10^6 perechi de baze (trei miliarde) în genomul uman . Duplicarea fidelă a ADN-ului doar unuia dintre acești cromozomi necesită un mecanism extrem de precis. Chiar și o rată de eroare de doar 10^6 (unul la un milion), ar crea 3.000 de erori (ceea ce este evident un număr excesiv) în fiecare ciclu de replicare a genomului. Deși nu este lipsită de erori și cea mai mare parte a evoluției nu ar fi avut loc dacă ar fi fost, un sistem de replicare a ADN-ului extrem de precis a evoluat în toate organismele.

După cum au remarcat Watson și Crick în paragraful final al articolului lor din 1953 (reprodus la pagina 279), modelul cu dublă spirală pe care l-au propus a oferit indiciul inițial despre cum poate avea loc replicarea. Acest mod de replicare a ADN-ului, denumit *replicare semiconservativă,* a fost curând confirmat experimental - prin numeroase studii efectuate pe virusuri și pe organisme procariote și eucariote. Odată ce *modelul general* de replicare a fost clarificat, cercetările s-au intensificat pentru a determina detaliile precise ale *sintezei ADN-ului* . Ceea ce s-a descoperit de atunci este că sunt necesare numeroase enzime și alte proteine pentru a copia o singură catenă de ADN. Din cauza complexității fenomenelor chimice *care* au loc în timpul sintezei, acest subiect este încă un domeniu de cercetare extrem de activ.

În acest capitol, vom discuta modelul general al replicării , precum și detaliile specifice ale sintezei ADN-ului. Cercetarea care a condus la aceste cunoștințe reprezintă o altă verigă în înțelegerea noastră a proceselor vitale la nivel molecular.

11.1

ADN-ul se reproduce prin replicare semiconservativă

Pentru Watson și Crick, era clar că, datorită aranjamentului și naturii bazelor azotate, fiecare catenă de ADN a dublei spirale putea servi drept șablon pentru sinteza catenei sale complementare (Figura 11.1). Ei au propus că, dacă spirala ar fi desfășurată, fiecare nucleotidă de-a lungul celor două catene parentale ar avea o afinitate pentru nucleotida sa complementară . După cum am văzut în Capitolul 10, complementaritatea se datorează potențialelor legături de hidrogen care se pot forma.

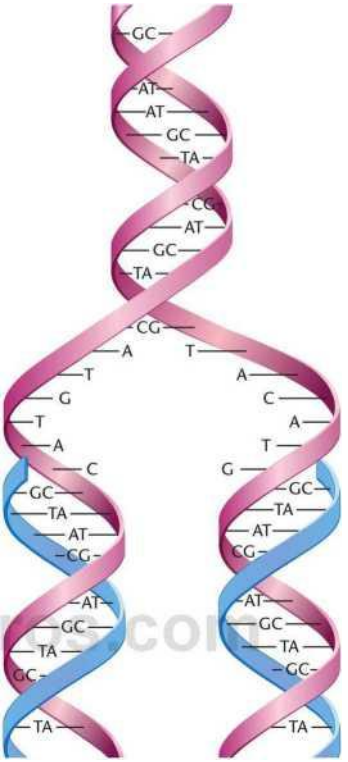


FIGURA 11.1 Model general de replicări semiconservative ale ADN-ului . Noua sinteză este prezentată cu albastru.

Nueva Vieja Vieja Nueva

formă. Dacă ar fi prezent acidul timidilic (T) , acesta ar „atrage" acidul adenilic (A); dacă ar fi prezent acidul guanidilic (G) , acesta ar atrage acidul citidilic (C); în mod similar , A ar atrage T, iar C ar atrage G. Dacă aceste nucleotide s-ar lega covalent împreună de-a lungul ambelor șabloane în lanțuri polinucleotidice , rezultatul ar fi producerea a două catene duble identice de ADN. Fiecare moleculă de ADN replicată ar consta dintr-o catenă „veche" și o catenă „nouă"; de unde și denumirea de replicare semiconservativă.

Există alte două forme posibile de replicare care utilizează , de asemenea , segmentele parentale ca șabloane (Figura 11.2). În replicarea conservativă, segmentele polinucleotidice complementare sunt sintetizate așa cum s-a descris mai sus . După sinteză, însă , cele două segmente nou create s- ar uni, iar segmentele parentale s-ar reasocia . În acest fel , helixul original ar fi „păstrat".

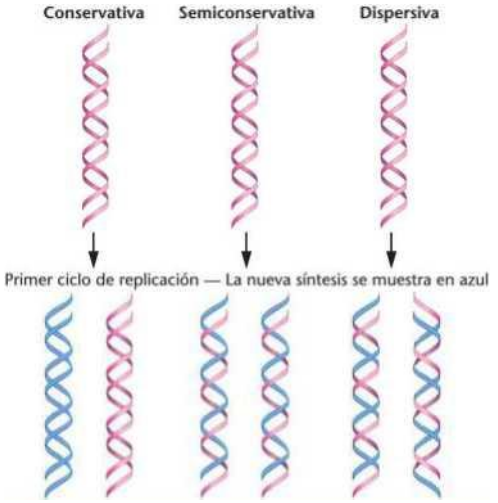


FIGURA 11.2 Rezultatele unui ciclu de replicare a ADN-ului pentru fiecare dintre cele trei moduri posibile în care s-ar putea realiza replicarea.

În a doua alternativă, numită replicare dispersivă, segmentele parentale ar fi dispersate între cele două noi duble helixuri după replicare. Astfel , fiecare segment ar fi compus atât din ADN vechi, cât și din ADN nou. Acest model ar implica tăierea segmentelor parentale în timpul replicării. Aceasta este cea mai complexă dintre cele trei posibilități și, prin urmare, este considerată cea mai puțin probabilă. Cu toate acestea, nu poate fi exclusă ca model experimental. Figura 11.2 prezintă rezultatele teoretice ale unui ciclu de replicare pentru fiecare dintre cele trei modele diferite.

Experimentul Meselson-Stahl

În 1958, Matthew Meselson și Franklin Stahl au publicat rezultatele unui experiment care a furnizat dovezi puternice că replicarea semiconservativă este metoda utilizată de celulele bacteriene pentru a produce noi molecule de ADN . Aceștia au crescut celule de E. coli *timp de* mai multe generații într-un mediu în care 15NH4Cl (clorură de amoniu) era singura sursă de azot. ^{15N} este un izotop „greu" al azotului care are un neutron în plus față de izotopul 14N natural ; $^{\text{prin urmare}}$, moleculele care conțin ^{15N} sunt mai dense decât cele care conțin ^{14N} . Spre deosebire de izotopii radioactivi , ^{15N} este stabil. După mai multe generații în acest mediu, aproape toate moleculele care conțin azot din celulele de E. *coli* , inclusiv bazele azotate ale ADN-ului, conțineau izotopul greu.

Cheia succesului acestui experiment constă în faptul că ADN-ul care conține ^{1sN} poate fi distins de ADN-ul care conține 14N. Procedura experimentală necesită ^{utilizarea} unei tehnici numite centrifugare de echilibru prin sedimentare, cunoscută și sub denumirea de *centrifugare prin flotație în gradient* de densitate . *În* această tehnică, probele sunt forțate prin centrifugare să migreze printr -un gradient de densitate al unei sări de metale grele , cum ar fi clorura de cesiu. Moleculele de ADN vor atinge echilibrul atunci când densitatea lor este egală cu cea a mediului cu gradient. În acest caz, ADN-ul ^{1sN} va ajunge în acest punct mai aproape de baza tubului decât $^{\text{ADN-ul}}$ 14N .

În acest experiment (Figura 11.3) , celulele marcate uniform cu ^{15N} au fost transferate într- un mediu care conținea doar ^{14NH4Cl} . Astfel , toată sinteza de ADN „nou" care are loc în timpul replicării conținea doar izotopul „ușor" $_{\text{al}}$ azotului . Momentul transferului a fost considerat timpul zero (t = 0). Celulele de E. *coli* au fost lăsate să se replice timp de mai multe generații, iar probele celulare au fost obținute după fiecare ciclu de replicare . ADN-ul a fost izolat din fiecare probă și centrifugat prin sedimentare la echilibru .

După o generație, ADN-ul izolat a apărut într -o singură bandă de densitate intermediară - rezultatul așteptat pentru replicarea semiconservativă , în care fiecare moleculă replicată consta dintr -o catenă nouă cu ^{14N} și o catenă veche cu ^{15N} (Figura 11.4). Acest rezultat a fost incompatibil cu predicția modelului de replicare conservativă , în care ar trebui să fie vizibile două benzi distincte și , prin urmare , acest model ar putea fi respins.

După două diviziuni celulare, probele de ADN au prezentat două benzi de densitate - o bandă intermediară și o bandă deschisă corespunzătoare poziției ^{l4N} în gradient . După o a treia generație , s - au obținut rezultate similare , cu excepția faptului că proporția benzii deschise a crescut. Din nou, acest lucru a fost în concordanță cu interpretarea conform căreia replicarea este semiconservativă.

Probabil ați observat deja că o moleculă cu densitate - intermediară este, de asemenea, compatibilă cu replicarea dispersivă . Cu toate acestea, Meselson și Stahl au respins acest model de replicare pe baza a două observații . În primul rând , după prima generație de replicare în mediul care conține ^{14N} , au izolat această moleculă hibridă și au denaturat-o cu căldură . Reamintim din Capitolul 10 că duplexul va separa în catene simple . Când a fost determinată densitatea catenelor simple ale hibridului , acestea au prezentat *un* profil de ^{15N} sau de ^{14} N, dar *nu* o densitate intermediară . Această observație este consistentă cu modelul semiconservativ, dar inconsistentă cu modelul dispersiv.

Mai mult, dacă replicarea ar fi dispersivă, *toate* generațiile de după $t = 0$ ar arăta ADN cu densitate intermediară. În fiecare generație după prima, raportul $^{15}N/^{14}N$ ar scădea, iar banda hibridă ar deveni din ce în ce mai ușoară, apropiindu-se în cele din urmă de banda ^{14}N. Acest rezultat nu a fost observat. Experimentul Meselson-Stahl a furnizat un rezultat foarte concludent pentru replicarea semiconservativă la bacterii și a ajutat la eliminarea modelelor conservative și dispersive.

ACUM REZOLVĂ ASTA

11.1 În experimentul Meselson-Stahl, care dintre cele trei moduri de replicare a putut fi exclus după un ciclu de replicare ? Și după două cicluri?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea naturii experimentului, precum și a diferenței dintre cele trei moduri posibile de replicare. Cheia rezolvării acesteia este determinarea modului în care nu s-ar crea elice „hibride" după un ciclu de replicare .*

Replicarea semiconservativă la eucariote

În 1957, cu un an înainte de publicarea lucrării lui Meselson și Stahl, J. Herbert Taylor, Philip Woods și Walter Hughes au prezentat dovezi că replicarea semiconservativă a avut loc și la organismele eucariote .

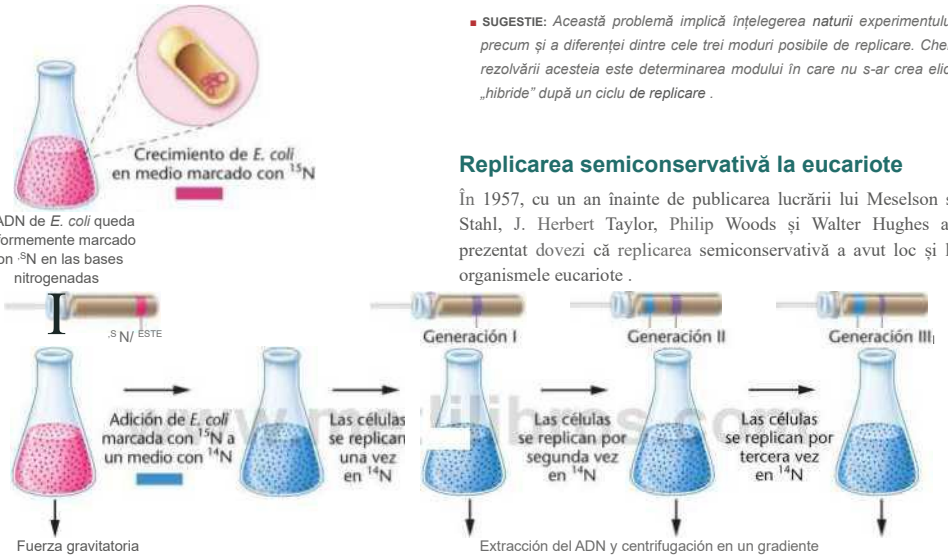

Crecimiento de E. coli en medio marcado con 15N
El ADN de E. coli queda uniformemente marcado con 15N en las bases nitrogenadas
Adición de E. coli marcada con 15N a un medio con 14N
Las células se replican una vez en 14N
Las células se replican por segunda vez en 14N
Las células se replican por tercera vez en 14N
Generación I
Generación II
Generación III
Fuerza gravitatoria
Extracción del ADN y centrifugación en un gradiente

FIGURA 11.3 Experimentul Meselson-Stahl.

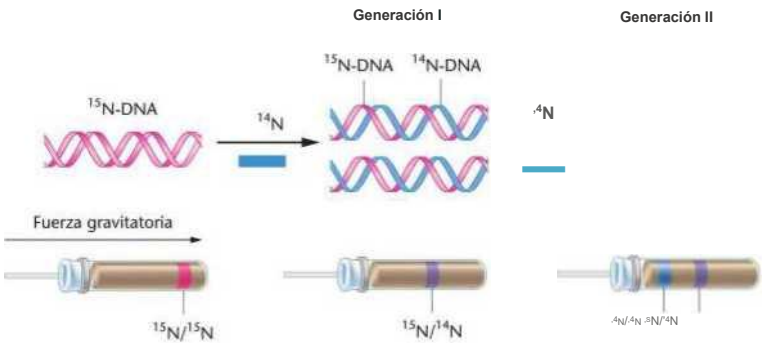


FIGURA 11.4 Rezultate așteptate în două generații de replicare semiconservativă în experimentul Meselson-Stahl.

Ei au experimentat cu vârfuri de rădăcini sau meristeme radiculare de fasole lată *(Vicia jaba),* care reprezintă o sursă excelentă de celule în diviziune. Acești cercetători au reușit să monitorizeze procesul de replicare prin marcarea ADN -ului cu timidină-'H, un precursor radioactiv al ADN-ului, și prin efectuarea autoradiografiei.

Autoradiografia este o tehnică obișnuită care, atunci când este aplicată preparatelor citologice, determină locația radioizotopului în interiorul celulei . În această procedură, emulsia fotografică este plasată pe un preparat histologic din material celular (vârfurile rădăcinilor în acest experiment), iar preparatul este depozitat într-un loc întunecat. Lama este developată într-un mod similar cu modul în care este procesată pelicula fotografică. După developare, și deoarece radioizotopul emite energie, emulsia devine neagră aproximativ în punctul de emisie . Rezultatul final este prezența -unor pete întunecate sau „granule" pe suprafața secțiunii , identificând astfel locația ADN-ului nou sintetizat în interiorul celulei.

Taylor și colegii săi au cultivat meristeme radiculare în prezența radioizotopului timp de aproximativ o generație, apoi le-au transferat într-un mediu nemarcat, unde diviziunea celulară a continuat. La sfârșitul fiecărei generații, culturile au fost oprite în metafază prin adăugarea de colchicină (un derivat chimic al șofranului care otrăvește fibrele fusului de creștere), iar cromozomii au fost examinați prin autoradiografie. Acești cercetători au descoperit timidină radioactivă asociată doar cu cromatidele care conțin ADN nou sintetizat . Figura 11.5 ilustrează replicarea unui singur cromozom în două cicluri de diviziune , precum și distribuția granulelor.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu modelul de replicare semiconservativ . După primul ciclu de replicare în prezența izotopului , se detectează radioactivitate în ambele cromatide surori, indicând faptul că fiecare cromatidă conține o catenă de ADN radioactivă nouă și o catenă veche , nemarcată. După al doilea ciclu de replicare , care *are loc, de asemenea , într-un mediu nemarcat,* doar una dintre cele două cromatide surori din fiecare cromozom ar trebui să fie radioactivă, deoarece jumătate din catenele parentale sunt nemarcate. Acesta este rezultatul observat, cu doar câteva excepții datorate *schimburilor de cromatide* surori (discutate în Capitolul 5).

Împreună, experimentele lui Meselson-Stahl și Taylor , Woods și Hughes au condus la acceptarea generală a modelului de replicare semiconservativ. Studiile ulterioare cu alte organisme au ajuns la aceeași concluzie și au susținut în mod clar propunerea lui Watson și Crick privind modelul cu dublă helix al ADN-ului.

Origini, furci de replicare și unități de replicare

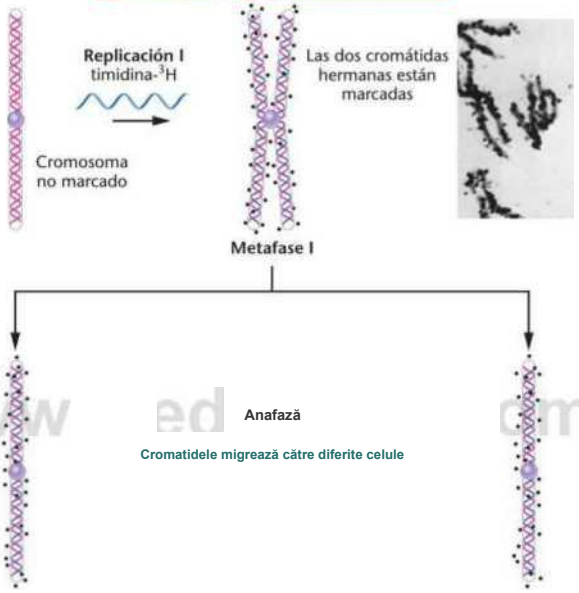
a înțelege mai bine replicarea semiconservativă , să analizăm pe scurt câteva întrebări importante. Prima se referă la originea replicării. Unde pe cromozom începe replicarea? Există o singură origine sau există mai multe puncte în care începe sinteza ADN-ului ? Este originea aleatorie sau este localizată într -o anumită regiune a cromozomului? În al doilea rând, odată ce începe replicarea , aceasta continuă de la origine într-o singură direcție sau în ambele direcții, îndepărtându-se de origine? Cu alte cuvinte, replicarea este *unidirecțională sau* bidirecțională *?*

Pentru a răspunde la aceste întrebări, trebuie să introducem două concepte. În primul rând, oriunde are loc replicarea pe cromozom , firele helixului se desfășoară , formând ceea ce se numește o furcă de replicare. Această furcă va apărea inițial la originea sintezei și, pe măsură ce replicarea progresează , se va deplasa de-a lungul duplexului ADN. Dacă replicarea este bidirecțională, vor exista două furci care migrează în direcții opuse de la origine . Al doilea concept se referă la lungimea ADN-ului care este replicat după ce are loc un eveniment de replicare la o singură origine. Această unitate de lungime se numește replicon .

Dovezile privind originea și direcția replicării sunt clare. John Cairns a urmărit replicarea în E. *coli* folosind precursori radioactivi pentru sinteza ADN-ului și autoradiografie. El a reușit să demonstreze că în *E. coli* Există o singură regiune unde începe replicarea , numită *oriC.* Prezența unei singure origini este -caracteristică bacteriilor, care au un singur cromozom circular. Deoarece sinteza ADN-ului la bacterii începe într- un singur punct, întregul cromozom constituie un replicon. La *E. coli,* repliconul este alcătuit din întregul genom de 4,6 Mb (4,6 milioane de perechi de baze) .

Figura 11.6 ilustrează interpretarea lui Cairns privind replicările ADN-ului în E. coli. Această interpretare (și micrografia însoțitoare) nu răspunde *la întrebarea* dacă sinteza este unidirecțională sau bidirecțională . Cu toate acestea , alte rezultate, derivate din studii asupra bacteriofagilor lambda, au demonstrat că replicarea este bidirecțională , îndepărtându-se de *oriC* în ambele direcții. Prin urmare , Figura 11.6 interpretează lucrarea lui Cairns pe baza acestei presupuneri. Replicarea bidirecțională creează două furci de replicare care migrează una de cealaltă pe măsură ce replicarea continuă . Când replicarea semiconservativă a întregului cromozom este completă , aceste furci converg la o regiune terminatoare -numită *ter.*

(Ia)


Replicación I
timidina-^{3}H
Cromosoma
no marcado
Las dos cromátidas
hermanas están
marcadas
Metafase I
Anafază
Cromatidele migrează către diferite celule

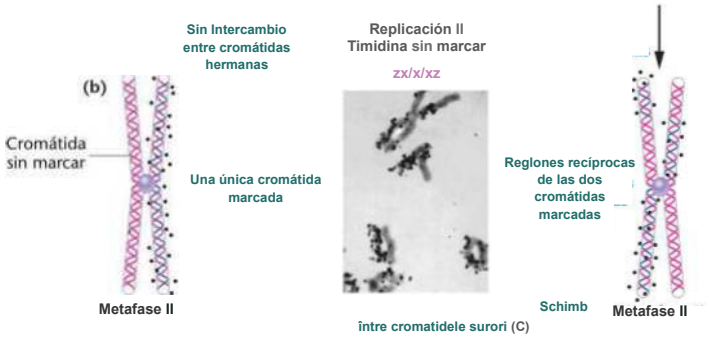


FIGURA 11.S Experimentul lui Taylor, Woods și Hughes care demonstrează modelul semiconservativ al replicării ADN-ului în meristemele radiculare ale *Vicia faba*. Fotografia de mai sus prezintă un fragment din plantă. (a) Un cromozom nemarcat parcurge ciclul celular în prezența timidinei-3H. La intrarea în mitoză, ambele cromatide surori ale cromozomului sunt marcate, așa cum se arată în autoradiogramă. După un al doilea ciclu de replicare (b), de data aceasta în absența timidinei-3H se așteaptă ca doar o cromatidă din fiecare cromozom să fie înconjurată de granule. Cu excepția cazurilor în care a avut loc schimbul reciproc între cromatidele surori (c), predicția este valabilă. Micrografiile sunt autoradiogramele reale obținute în experiment.

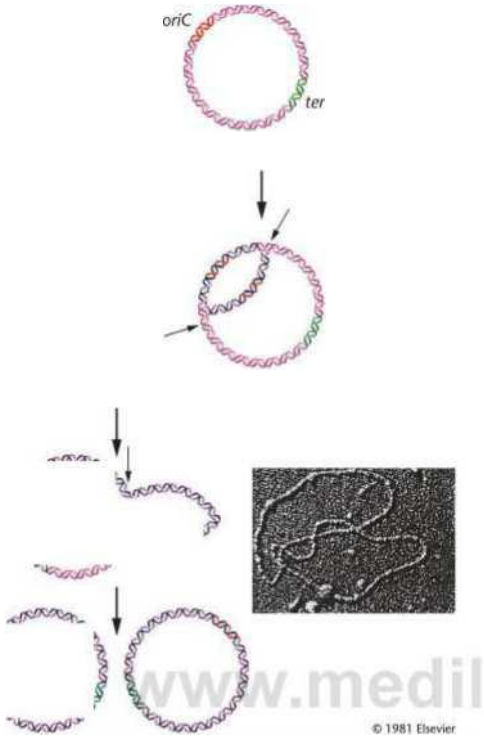


FIGURA 11.6 Replicare bidirecțională a *cromozomului E. coli.* Săgețile subțiri indică mișcarea furcilor de replicare. Micrografia prezintă un cromozom bacterian în curs de replicare, comparabil cu imaginea alăturată.

Mai târziu în capitol vom vedea că la eucariote fiecare cromozom conține mai multe puncte de origine.

11.2

Cinci polimeraze și alte enzime participă la sinteza ADN-ului la bacterii.

Afirmația că replicarea este semiconservativă și bidirecțională descrie *modelul general* al duplicării ADN-ului și asocierea dintre catenele complete odată ce sinteza este completă. Cu toate acestea, spune puține despre cum are loc *sinteza propriu-zisă* a unui lanț polinucleotidic lung, complementar, dintr-un șablon de ADN. Ca în majoritatea studiilor de biologie moleculară, această întrebare a fost inițial abordată folosind microorganisme. Cercetarea sintezei ADN-ului a început în același timp cu munca lui Meselson-Stahl și rămâne un domeniu activ de cercetare astăzi . Ceea ce este cel mai evident din această cercetare este complexitatea enormă a sintezei ADN-ului biologic .

ADN polimeraza I

Prima publicație despre enzimologia replicării ADN - ului a fost realizată de Arthur Kornberg și colaboratorii săi în 1957. Acești cercetători au izolat o enzimă din *E. coli* care putea dirija sinteza ADN-ului într - un sistem fără celule (*in vitro)* . Această enzimă se numește ADN polimerază I, deoarece a fost prima dintre mai multe enzime similare izolate .

Kornberg a stabilit că pentru ca ADN polimeraza I să dirijeze sinteza ADN-ului *in vitro,* Necesită două componente importante: (1) cei patru dezoxiribonucleozid trifosfați (dNTP) și (2) ADN matriță. Dacă oricare dintre cei patru dezoxiribonucleozid trifosfați este omis din reacție , nu se detectează nicio sinteză . Dacă se utilizează derivați ai acestor molecule precursoare , alții decât nucleozid trifosfații (nucleotide sau nucleozid difosfați) , nu are loc sinteza . Dacă nu se adaugă ADN matriță , sinteza ADN-ului ar avea loc în continuare , dar mult redusă.

Cea mai mare parte a sintezei dirijate de enzima Kornberg pare să fie exact așa cum este necesar pentru replicarea semiconservativă . Reacția este rezumată în Figura 11.7, care ilustrează adăugarea unui singur nucleotid. S-a demonstrat că enzima constă dintr - un singur polipeptid care conține 928 de aminoacizi.

Modul în care fiecare nucleotidă este adăugată la lanțul în - creștere depinde de specificitatea ADN polimerazei I. După cum se arată în Figura 11.8 , precursorul dNTP conține toate cele trei grupări fosfat atașate la capătul de carbon 5' al dezoxiribozei. Deoarece cei doi fosfați terminali sunt scindați în timpul sintezei , fosfatul rămas atașat la capătul de carbon 5' devine legat covalent de gruparea 3' - OH a dezoxiribozei la care este adăugat. Astfel , alungirea lanțului are loc în direcția 5'-3' prin adăugarea câte unui nucleotid la capătul 3' în creștere . Fiecare etapă furnizează o nouă grupare 3'-OH expusă , care poate participa la următoarea adăugare de nucleotide pe măsură ce sinteza ADN-ului continuă .

După ce a izolat ADN polimeraza I și i - a demonstrat activitatea catalitică , Kornberg a dorit apoi să testeze acuratețea , sau fidelitatea, cu care enzima a replicat șablonul de ADN. Întrucât tehnologia de verificare a secvențelor nucleotidice ale șablonului și ale catenei nou sintetizate nu era încă disponibilă în 1957 , el a trebuit inițial să se bazeze pe mai multe metode indirecte .

Una dintre metodele lui Kornberg a implicat compararea compoziției bazelor azotate ale ADN- ului matriță cu

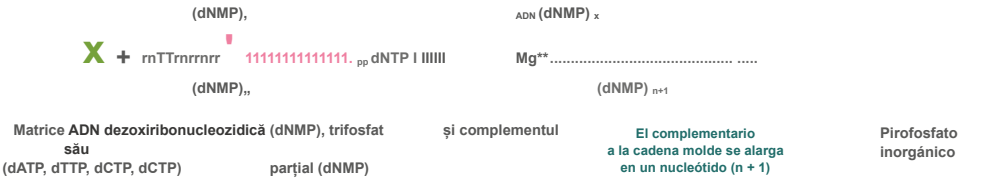

(dNMP),
ADN (dNMP) x
X + rnTTrnrrnrr 11111111111111. pp dNTP I IIIIII
Mg**.....
(dNMP)„
(dNMP) n+1
Matrice ADN dezoxiribonucleozidică sau (dATP, dTTP, dCTP, dCTP)
(dNMP), trifosfat parţial (dNMP)
şi complementul
El complementario a la cadena molde se alarga en un nucleótido (n + 1)
Pirofosfato inorgánico

FIGURA 11.7 Reacţie chimică catalizată de ADN polimeraza I. În fiecare etapă, se adaugă la lanţul în creştere un singur nucleotid, complementar şablonului de ADN, utilizând ca substrat un nucleozid trifosfat. Eliberarea pirofosfatului anorganic determină energetic reacţia.

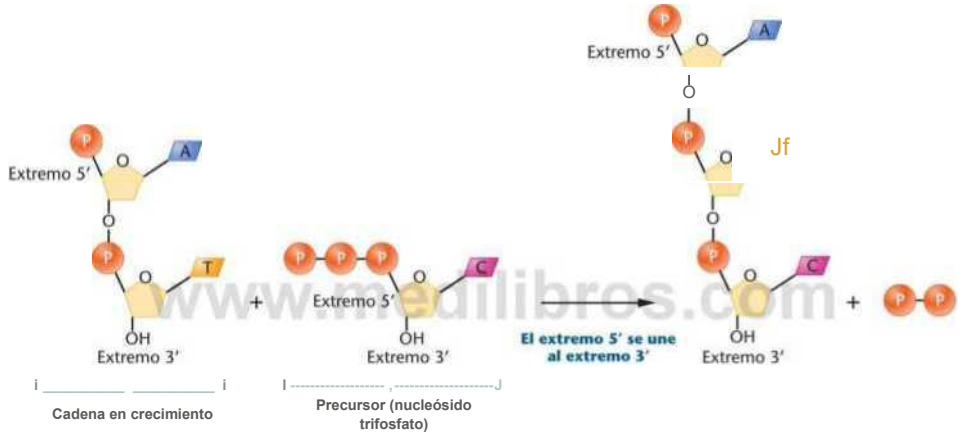


FIGURA 11.8 Descrierea sintezei 5'-3' a ADN-ului.

cea a ADN-ului produs. Tabelul 11.1 prezintă analiza compoziţiei de bază Kornberg a trei şabloane de ADN diferite. În limitele erorii experimentale, compoziţia de bază a fiecărui produs a fost în concordanţă cu cea a ADN-ului şablon utilizat. Aceste date, împreună cu

TABELUL 11.1

Compoziţia de bază a ADN-ului şablon şi a produsului de replicare în cercetările timpurii ale lui Komberg

Corp	Mcij de sau produs	%A	%T	%C	%C
T2	Mucegai	32,7	33,0	16,8	17,5
	Produs	33.2	32.1	17.2	17,5
E. coli	Mucegai	25,0	24.3	24,5	26.2
	Produs	26.1	25.1	24.3	24,5
Viţel	Mucegai	28,9	26,7	22,8	21,6
	Produs	28,7	27,7	21,8	21,8

Sursa: Kornberg (1960).

împreună cu alte tipuri de comparaţii între matriţe şi produse, a sugerat că matriţele au fost reproduse cu fidelitate.

ADN polimerazele II, III, IV şi V

Deşi ADN polimeraza I dirijează în mod clar sinteza ADN-ului, în 1969 au apărut îndoieli serioase cu privire la adevărata funcţie biologică a enzimei. Paula DeLucia şi John Cairns au descoperit o tulpină mutantă de *E. coli* care era deficitară în activitatea ADN polimerazei I. Această mutaţie a fost numită *pol11*. În absenţa enzimei funcţionale, această tulpină mutantă de *E. coli* şi-a duplicat totuşi ADN-ul şi s-a reprodus cu succes. Cu toate acestea, aceste celule aveau un deficit sever în capacitatea lor de a repara ADN-ul. De exemplu, tulpina mutantă era extrem de sensibilă la lumina ultravioletă (UV) şi la radiaţii, care deteriorează ADN-ul şi sunt mutagene. Bacteriile non-mutante pot repara o mare parte din daunele induse de UV.

Aceste observații au condus la două concluzii:

1. Trebuie *să* existe cel *puțin o* altă enzimă prezentă în celulele *E.* coli care este responsabilă de replicarea ADN-ului *in vivo.*
2. ADN polimeraza I trebuie să aibă o funcție secundară *in vivo,* despre care se crede în prezent a fi esențial pentru menținerea fidelității sintezei ADN -ului.

Până în prezent , patru ADN polimeraze au fost izolate din celule cărora le lipsește activitatea ADN polimerazei I și din celule normale care conțin polimeraza I. Tabelul 11.2 compară caracteristicile ADN polimerazei I cu cele ale ADN polimerazelor II și III. Deși niciuna dintre cele trei nu poate *iniția* sinteza ADN dintr-un șablon, toate pot *alungi* o catenă de ADN existentă , numită primer .

Proprietățile ADN polimerazelor bacteriene I, II și III

Proprietăți			al III-le a
Inițierea sintezei lanțului	—	—	—
Polimerizare 5'-3'	+	+	—
Activitatea exonucleazei 3'-5'	+	+	—
Activitatea exonucleazei 5'-3'	+	—	—
Molecule de polimerază/celulă	400	?	15

enzimele ADN polimerază sunt proteine mari cu o greutate moleculară care depășește 100.000 de daltoni (Da). Toate trei posedă activitate exonudeazică 3'-5', ceea ce înseamnă că au potențialul de a polimeriza într-o direcție, de a se opri, de a inversa direcția și de a scinda nucleotidele pe care tocmai le-au adăugat. După cum vom vedea mai târziu în acest capitol, această activitate oferă capacități de corectare a erorilor pentru ADN-ul nou sintetizat prin eliminarea și înlocuirea nucleotidelor incorecte.

ADN polimeraza I prezintă, de asemenea, activitate exonucleazică 5'-3'. Această capacitate îi permite să scindeze nucleotidele începând de la capătul unde a început sinteza și continuând în aceeași direcție. Două observații ar putea explica de ce Kornberg a izolat polimeraza I și nu polimeraza III: există o cantitate mult mai mare de polimerază I decât polimerază III și este, de asemenea, mult mai stabilă.

Care este funcția celor trei polimeraze *in vivo?* Polimeraza II este enzima responsabilă de polimerizarea 5'-3' esențială pentru replicarea in *vivo* . Activitatea sa exonucleazică 3'-5' asigură și corectura, care este activată atunci când este inserat un nucleotid incorect. Când se întâmplă acest lucru, sinteza se oprește și polimeraza „ inversează cursul", eliminând nucleotidul incorect . Apoi continuă în direcția 5'- 3' , sintetizând catena complementară catenei șablon . Se crede că polimeraza I este responsabilă pentru îndepărtarea primerului și pentru sintetizarea lacunelor care apar după această îndepărtare . Activitatea sa exonucleazică îi permite , de asemenea , să participe la repararea ADN-ului . Polimeraza II , împreună cu polimerazele IV și V, participă la diverse aspecte ale reparării ADN-ului care a fost deteriorat de agenți externi , cum ar fi lumina ultravioletă . Polimeraza II este codificată de o genă care este activată atunci când sinteza ADN-ului este întreruptă la furca de replicare.

Încheiem această secțiune subliniind complexitatea moleculei - de ADN polimerază III. Spre deosebire de ADN polimeraza I , care este compusă dintr -o singură polipeptidă, forma activă a ADN polimerazei III este o holoenzimă - o enzimă complexă formată din mai multe subunități. Polimeraza III este compusă din zece tipuri de subunități polipeptidice (Tabelul 11.3) și are o greutate moleculară de 900.000 Da. Cea mai mare subunitate, *α,* are o greutate moleculară de 140.000 Da și, împreună cu *subunitățile e și δ,* constituie un nucleu enzimatic responsabil pentru activitatea de polimerizare . Subunitatea α *este* responsabilă pentru polimerizarea nucleotidelor conform catenelor șablon , în timp ce subunitatea e a nucleului enzimatic posedă activitate exonucleazică 3'-5' . O singură holoenzimă de ADN polimerază I_{II} conține, împreună cu alte componente, două nuclee enzimatice combinate într - un dimer.

Un al doilea grup de cinci subunități (y, Ô, 6', *x* și </») formează ceea ce se numește complexul y, care este implicat în „ încărcarea " enzimei pe șablon la furca de replicare . Această funcție enzimatică necesită energie și este dependentă de hidroliza ATP-ului . Subunitatea [3 *J* Acționează ca o „clemă" pentru a împiedica nucleul enzimei să

Subunități holoenzimatice ale ADN polimerazei III

Grupări de funcții de subunități	
Nucleul enzimatic: prelungește lanțul polinucleotidic și efectuează corectarea erorilor	Polimerización 5'-3' Exonucleasa 3'-5' Ensamblaje del núcleo
Încărcarea enzimei în matriță (care acționează ca o clemă de încărcare)	■y *E* *8 > 8'* ■A. *a*
Clema glisantă (factorul de continuitate) dimerizează nucleul enzimei,	Complejo *y*

TABLA 11.3

separându-l de șablon în timpul polimerizării. În cele din urmă, funcția subunității r este de a dimeriza cele două nuclee ale polimerazei, facilitând sinteza simultană a ambelor catene ale helixului la furca de replicare. Această holoenzimă, împreună cu alte proteine prezente la furca de replicare, formează un complex imens (aproape la fel de mare ca un ribozom) cunoscut sub numele de replisom. Mai târziu în acest capitol, vom analiza funcția ADN polimerazei III.

11.3

Multe probleme complexe trebuie rezolvate în timpul replicării ADN-ului.

Până acum, am stabilit că la bacterii și virusuri, replicarea este semiconservativă și bidirecțională de-a lungul unui singur replicon. De asemenea, știm că sinteza este catalizată de ADN polimeraza III și are loc în direcția 5'-3'. Sinteza bidirecțională creează două furci de replicare care se mișcă în direcții opuse față de originea sintezei. Cu toate acestea, așa cum vom vedea în punctele următoare, mai - trebuie să rezolvăm multe întrebări pentru a stabili un model coerent de replicare a ADN-ului :

1. Trebuie să existe un mecanism prin care helixul se desface local, iar configurația „deschisă" rezultată trebuie stabilizată astfel încât sinteza să poată progresa de-a lungul ambelor catene de ADN.
2. Pe măsură ce ADN-ul se desface și se sintetizează, tensiunea cauzată de înfășurarea crescută în josul helixului trebuie redusă .
3. Trebuie sintetizat un anumit tip de primer pentru ca polimerizarea să poată începe sub conducerea ADN polimerazei HI. În mod surprinzător, ARN-ul, nu ADN-ul, servește drept primer.
4. Odată ce primerii ARN au fost sintetizați, ADN polimeraza III începe să sintetizeze complementul de ADN al ambelor catene din molecula părinte. Deoarece cele două catene sunt antiparalele una față de cealaltă, sinteza continuă este posibilă doar pe o catenă în direcția în care se mișcă furca de replicare . Pe cealaltă catenă, sinteza trebuie să fie discontinuă și, prin urmare, implică un proces ușor diferit.
5. ARN trebuie eliminați înainte ca replicarea să fie completă . Golurile care se formează temporar trebuie umplute cu ADN complementar șablonului la fiecare situs.
6. Catenele de ADN nou sintetizate care umplu fiecare dintre golurile temporare trebuie legate de catena de ADN adiacentă .
7. Deși ADN polimerazele inserează cu precizie baze complementare în timpul replicării , ele nu sunt perfecte și , prin urmare, ocazional, nucleotide incorecte sunt adăugate în lanțul în creștere. Prezența unui proces de corectare a erorilor pentru a rectifica aceste greșeli este inerentă sintezei ADN-ului.

Pe măsură ce discutăm fiecare dintre aceste puncte , examinați figurile 11.9, 11.10, 11.11 și 11.12 pentru a vedea cum este rezolvată fiecare dintre aceste probleme . Figura 11.13 rezumă modelul de sinteză a ADN-ului .

Derularea helixului ADN-ului

Așa cum am discutat anterior, în cromozomul circular al majorității bacteriilor și virusurilor există o singură origine a sintezei ADN-ului . Această regiune a fost studiată în special în *cromozomul E. coli.* Originea replicării, numită *oriC,* Este alcătuită din 245 de perechi de nucleotide și este caracterizată prin prezența unor secvențe repetitive de 9 și 13 baze (numite 9meri și 13meri). După cum se arată în Figura 11.9, proteina responsabilă de etapa inițială în desfășurarea helixului este o proteină specifică numită DnaA (deoarece este codificată de gena numită dnaA) . Câteva subunități ale proteinei DnaA se leagă de fiecare dintre diferiții 9meri . Această etapă facilitează legarea ulterioară a proteinelor DnaB și DnaC , care deschid și destabilizează în continuare helixul. Aceste proteine, care necesită energia furnizată în mod normal de hidroliza ATP pentru a rupe legăturile de hidrogen și a denatura dubla helix, se numesc helicaze. Alte proteine, numite proteine de legare *la o singură catenă* (SSBP *),* Ele stabilizează această conformație deschisă .

ce desfășurarea continuă , tensiunea de înfășurare se acumulează în fața furcii de replicare , rezultând adesea superînrăsucire . În moleculele circulare , superînrăsucirea poate lua forma unor răsuciri și ture suplimentare în ADN , similară cu înfășurarea care s-ar forma într -o bandă de cauciuc atunci când este întinsă și apoi răsucită în mod repetat la un capăt. Această superînrăsucire poate fi relaxată prin acțiunea ADN girazei , o enzimă aparținând grupului mare de enzime cunoscute sub numele de topoizomeraze ADN . Giraza face tăieturi într- una sau ambele catene și catalizează, de asemenea, mișcări locale care au efectul de a desface răsucirile și nodurile care s-au format în timpul superînrăsucirii . ADN-ul își restabilește apoi structura

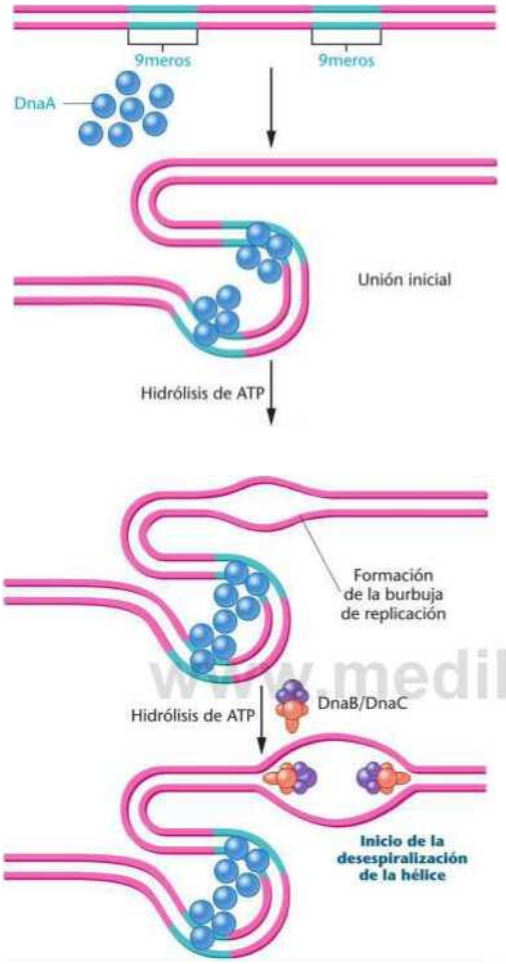


FIGURA 11.9 Derularea helixului ADN în timpul replicării, realizată de proteinele DnaA, DnaB și DnaC. Îmbinarea inițială a multor monomeri DnaA are loc la situsurile ADN care conțin secvențe repetate de 9 nucleotide, numite 9meri. Cei 13meri, care sunt și ei implicați, nu sunt arătați.

integritatea lanțurilor . Aceste diverse reacții sunt controlate de energia eliberată în timpul hidrolizei ATP-ului.

Împreună, ADN-ul , complexul polimerazei și enzimele asociate constituie un grup ordonat de molecule care participă la sinteza ADN-ului și fac parte din ceea ce am numit anterior *replisom.*

Inițierea sintezei ADN-ului folosind un primer ARN

Odată ce o mică porțiune a helixului este derulată, ce altceva este necesar pentru a iniția sinteza ? După cum am văzut deja, ADN polimeraza III necesită un primer cu o grupare 3 -hidroxil liberă pentru a alungi un lanț polinucleotidic. Întrucât niciunul nu este disponibil pe un cromozom circular, această absență i-a determinat pe oamenii de știință să investigheze cum ar putea fi adăugat primul nucleotid. În prezent, nu există nicio îndoială că ARN-ul servește ca primer pentru a iniția sinteza ADN-ului .

segment scurt de ARN (cu o lungime de aproximativ 10 până la 12 nucleotide) complementar ADN-ului este sintetizat pe șablonul ADN . ARN-ul este sintetizat sub conducerea unui tip de ARN polimerază numită primază, care nu necesită un capăt 3' liber pentru a iniția sinteza. La acest segment scurt de ARN ADN polimeraza III începe să adauge dezoxiribonucleotide, inițiind sinteza ADN-ului. Figura 11.10 prezintă o diagramă conceptuală a inițierii pe un șablon ADN. Ulterior, primerul ARN trebuie tăiat și înlocuit cu ADN. Se crede că ADN polimeraza I direcționează acest proces. Primerii ARN au fost găsiți în virusuri, bacterii și diverse organisme eucariote, iar acesta se consideră a fi un fenomen universal în timpul inițierii sintezei ADN -ului .

Sinteza continuă și discontinuă a ADN-ului

Trebuie acum să reconsiderăm faptul că cele două catene de ADN ale unei duble spirale sunt antiparalele una față de cealaltă - adică una se desfășoară în direcția 5'-3', în timp ce cealaltă are polaritatea opusă, 3'-5'. Deoarece ADN polimeraza III sintetizează ADN doar în direcția 5'-3', sinteza în timpul avansării furcii de replicare are loc într-o direcție pe o catenă și în direcția opusă pe cealaltă.

Prin urmare, pe măsură ce lanțurile se desfășoară și furca de replicare avansează de-a lungul helixului (Figura 11.11),

FIGURA 11.10 Începutul sintezei ADN-ului . Mai întâi , se sintetizează un primer ARN complementar, la care se adaugă ADN. Sinteza are loc în direcția 5'-3'. În final , primerul ARN este înlocuit cu ADN, sub conducerea ADN polimerazei I.

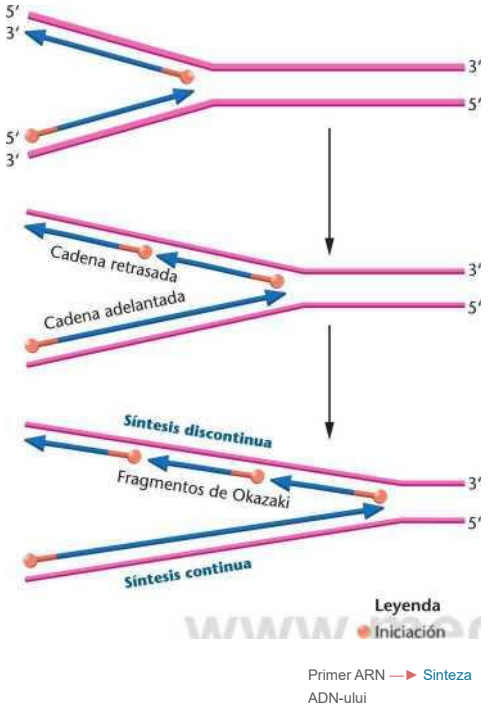


FIGURA 11.11 Polaritatea opusă a sintezei de-a lungul celor două catene de ADN este necesară deoarece cele două catene sunt antiparalele una față de cealaltă și deoarece ADN polimeraza III sintetizează doar într- o singură direcție (5'-3'). Pe catena întârziată, sinteza trebuie să fie discontinuă, rezultând producerea de fragmente Okazaki. Pe catena conducătoare, sinteza este continuă. Primerii ARN sunt utilizați pentru a iniția sinteza pe ambele catene.

Doar o singură catenă poate servi drept șablon pentru sinteza - continuă a ADN-ului . Această catenă de ADN nou sintetizată se numește catena conducătoare. Pe măsură ce furca de replicare avansează, sunt necesare multe situsuri de inițiere pe șablonul de ADN opus, rezultând o sinteză discontinuă a ADN-ului pe așa-numita catenă întârziată.

Reiji și Tuneko Okazaki au fost primii care au furnizat dovezi care susțin existența sintezei discontinue a ADN-ului. Ei au descoperit că, atunci când ADN-ul bacteriofag se replică în *E. coli,* unele dintre moleculele de ADN nou formate, care sunt ținute împreună prin legături de hidrogen, sunt separate în fragmente mai mici, nedigerabile.

Deoarece sinteza ADN-ului este continuă pe o catenă și discontinuă pe cealaltă , termenul de sinteză semi- discontinuă este uneori folosit pentru a descrie întregul proces. Nucleotidele atașate la catena matriță sunt fragmente mici care conțin între 1.000 și 2.000 de nucleotide. Primerii ARN fac parte din toate aceste fragmente. Aceste fragmente, numite acum fragmente Okazaki , sunt încorporate în catene de ADN din ce în ce mai lungi și mai grele pe măsură ce sinteza progresează .

Sinteza discontinuă a ADN-ului necesită enzime pentru a îndepărta primerul ARN și pentru a uni fragmentele Okazaki de pe catena întârziată. Așa cum s-a menționat anterior, ADN polimeraza I îndepărtează primerii și înlocuiește nucleotidele lipsă. Unirea fragmentelor este sarcina ADN ligazei , care catalizează formarea legăturii fosfodiesterice ce sigilează golurile dintre catenele sintetizate discontinuu. Dovezile că ADN ligaza îndeplinește această funcție în timpul sintezei ADN-ului sunt întărite de observarea unei tulpini mutante de *E. coli (lig)* cu deficit de ligază , în care se acumulează un număr mare de fragmente Okazaki neunite.

Sinteza în catena conducătoare și în cea întârziată este simultană.

Având în vedere modelul de mai sus, ne putem întreba cum realizează ADN polimeraza III sinteza ADN-ului din catena conducătoare și catena întârziată . Pot fi replicate ambele catene simultan la aceeași furcă de replicare sau sunt două evenimente distincte, care necesită două copii separate ale enzimei? Dovezile - sugerează că ambele catene pot fi replicate simultan . Așa cum este ilustrat în Figura 11.12 , dacă catena întârziată formează o buclă, polimerizarea nucleotidelor poate avea loc pe ambele catene șablon sub direcția unui singur dimer enzimatic. După sinteza a 1000 până la 2000 de nucleotide, monomerul enzimatic de pe catena întârziată va întâlni un fragment Okazaki complet , moment în care eliberează catena întârziată. Se formează apoi o nouă buclă cu catena șablon întârziată, iar procesul se repetă. Bucla inversează orientarea șablonului, dar nu și direcția reală de sinteză pe catena întârziată, care are loc întotdeauna în direcția 5'-3'.

O altă caracteristică importantă a holoenzimei care facilitează - sinteza la furca de replicare este un dimer al subunității j3, care formează o structură de fixare în jurul duplexului de ADN nou format. Această fixare a subunității j3 împiedică nucleul enzimei (subunitățile *a și e)* să... și *0,* care sunt responsabile pentru catalizarea adăugării de nucleotide) se desprinde de șablon pe măsură ce - polimerizarea continuă. Deoarece întreaga holoenzimă se mișcă de-a lungul duplexului parental, avansând furca de replicare , dimerul subunității *0* Se numește în mod obișnuit *clemă glisantă* .

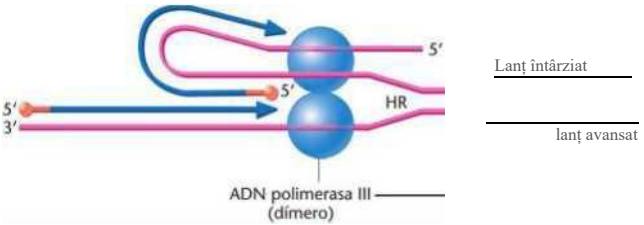


FIGURA 11.12 Ilustrație a modului în care se poate realiza sinteza simultană a ADN-ului din catenele conducătoare și întârziată la aceeași furcă de replicare (HR). Catena matriță întârziată formează o buclă pentru a inversa direcția fizică, dar nu și pe cea biochimică, a sintezei. Enzima funcționează ca un dimer, în care fiecare nucleu enzimatic sintetizează pe una dintre cele două catene.

Detectarea și corectarea erorilor au loc în timpul replicării ADN-ului

Scopul imediat al replicării ADN-ului este sinteza unei noi catene care să fie un complement exact al catenei șablon la fiecare poziție nucleotidică. Deși acțiunea ADN-polimerazelor este extrem de precisă, procesul de sinteză nu este perfect și, ocazional, un nucleotid necomplementar este inserat incorect . Pentru a compensa astfel de inexactități, toate ADN-polimerazele posedă activitate exonucleazică 3'-5'. Această proprietate le permite să detecteze și să scindeze un nucleotid nepotrivit (în direcția 3' către 5'). Odată ce acest nucleotid a fost scindat , sinteza poate continua de la 5' la 3 ' . Acest proces, numit corectură, crește fidelitatea sintezei cu un factor de 100. În cazul holoenzimei ADN polimerazei III, subunitatea direct implicată în corectură este epsilon (ε). În tulpinile de *E. coli* care au o mutație ce face ca subunitatea s să fie nefuncțională, rata de eroare (rata de mutație) în timpul sintezei ADN-ului este mult crescută.

11.4 Un model coerent care rezumă replicarea ADN-ului

Acum putem combina diversele aspecte ale replicării ADN-ului care au loc la o singură furcă de replicare într-un model coerent, prezentat în Figura 11.13. Pe măsură ce furca avansează, helicaza desface dubla spirală. Odată desfăcută, proteinele de legare monocatenare se asociază cu catenele , împiedicând reformarea - dublei spirale . Anticipând furca de replicare , ADN giraza - acționează pentru a reduce tensiunea generată de superînrăsucirea spiralei . Fiecare jumătate a polimerazei dimerice este un nucleu enzimatic legat de una dintre catenele șablon printr-o subunitate γ3 care funcționează ca o clemă glisantă. Sinteza continuă are loc

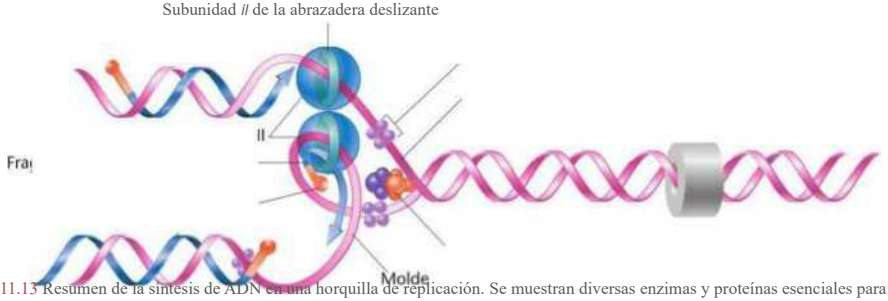


FIGURA 11.13 Resumen de la síntesis de ADN en una horquilla de replicación. Se muestran diversas enzimas y proteínas esenciales para este proceso.

pe catena conducătoare , în timp ce catena întârziată trebuie să formeze o buclă , astfel încât sinteza simultană (concurentă) să poată avea loc pe ambele catene. Deși nu este prezentată în figură, acțiunea ADN polimerazei I și a ADN ligazei este esențială pentru replicarea catenei întârziate, acționând împreună pentru a înlocui primerul ARN și a uni, respectiv, fragmentele Okazaki.

Întrucât cercetarea sintezei ADN-ului este încă un domeniu extrem de activ, acest model va fi, fără îndoială, extins în viitor. Între timp, oferă o sinteză a ADN-ului care permite interpretarea fenomenelor genetice.

ACUM REZOLVĂ ASTA

11.2 Imaginați-vă că investigăm un organism extraterestru . Atunci când studiem replicarea ADN-ului său, se observă o caracteristică distinctivă: nu există fragmente Okazaki. Creați un model ADN care să fie în concordanță cu această observație.

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea procesului de sinteză a ADN-ului la organismele procariote, ilustrat în Figura 11.13. Cheia rezolvării acesteia constă în a analiza motivul pentru care se observă fragmente Okazaki în timpul sintezei ADN-ului și modul în care formarea lor se leagă de structura ADN-ului, așa cum este descrisă în modelul Watson-Crick.*

11,5

Replicarea este controlată de o varietate de gene

O mare parte din ceea ce știm despre replicarea ADN-ului la virusuri și bacterii se bazează pe analiza genetică a procesului . De exemplu, am discutat deja studiile asupra *mutației pol11,* care au relevat că ADN polimeraza I nu este enzima principală responsabilă de replicare . Există multe alte mutații care perturbă sau afectează serios anumite aspecte ale replicării, cum ar fi mutațiile de deficit de ligază și de deficit de corectură menționate anterior. Deoarece multe dintre acestea sunt letale, analiza genetică utilizează frecvent mutații condiționate, care sunt exprimate într-o anumită condiție, dar nu în alta. De exemplu, o mutație sensibilă la temperatură s-ar putea să nu fie exprimată la o *temperatură permisivă* specifică . Atunci când celulele mutante sunt cultivate la o *temperatură restrictivă,* fenotipul mutant este exprimat și poate fi studiat. Prin examinarea efectului pierderii funcției asociate cu mutația, cercetarea acestor mutanți sensibili la temperatură poate oferi informații despre produsul genic și funcția asociate cu gena normală, non-mutantă.

După cum se arată în Tabelul 11.4, *E. coli* posedă mai multe gene care specifică subunitățile ADN polimerazei și codifică produse implicate în originea specificației sintezei, desfășurarea și stabilizarea helixului, inițiere și amorsare, relaxarea superînrăsucirii, reparare și ligare. Descoperirea unui grup atât de mare de gene mărturisește complexitatea procesului de replicare, chiar și la procariotele relativ simple. Această complexitate nu este neașteptată, având în vedere cantitatea enormă de ADN care trebuie replicată fără erori într-un timp foarte scurt. După cum vom vedea în secțiunea următoare, procesul la eucariote este și mai complicat și, prin urmare, mai dificil de investigat.

Lista unor *gene E. coli* și a produselor sau funcțiilor acestora în timpul replicării

TABLA 11.4

Produs sau funcție genetică	
ADN polimeraza I *polA*	
ADN-ul polB E, N, Q, X, Z	ADN polimerază II Subunități ale ADN polimerazei III
ADNc	Primasa
ADN-ul A, 1, P	Inițiere
ADNB, C	Helicază în oriC
gyrA, B	Subunități de girază
	Ligi
reprezentant	Helicază
SSB	Proteine de legare cu lanț unic
subunitatea ARN polimerazei ***rpoB***	

11.6

Replicarea ADN-ului la eucariote este similară cu replicarea la procariote, deși mai complexă.

Replicarea ADN-ului eucariot are multe caracteristici comune cu replicarea bacteriană. În ambele sisteme, ADN-ul bicatenar se desface la originile replicării , se formează furci de replicare , iar sinteza bidirecțională a ADN-ului generează catene conducătoare și întârziate din șabloane de ADN monocatenare sub îndrumarea ADN- polimerazei . Polimerazele eucariote au aceleași cerințe fundamentale pentru sinteza ADN-ului ca și polimerazele bacteriene: patru dezoxiribonucleozide trifosfați, un șablon și un primer . Cu toate acestea, replicarea ADN-ului eucariot este mai complexă datorită mai multor caracteristici ale ADN-ului eucariot . Celulele eucariote conțin mult mai mult ADN, acest ADN formează un complex cu nucleozomii, iar cromozomii eucarioți

sunt liniari mai degrabă decât circulari . În această secțiune, vom descrie câteva dintre modalitățile prin care organismele eucariote rezolvă această complexitate suplimentară.

Inițiere la origini multiple de replicare

Cea mai evidentă diferență dintre replicarea ADN-ului eucariot și procariot este că replicarea în organismele eucariote trebuie să gestioneze cantități mult mai mari de ADN. De exemplu, celulele de drojdie conțin de trei ori mai mult ADN decât celulele E. coli , iar celulele *Drosophia conțin* de 40 de ori mai mult. În plus, ADN polimerazele eucariote sintetizează ADN-ul la o rată de 25 de ori mai lentă (aproximativ 2.000 de nucleotide pe minut) decât în organismele procariote. În aceste condiții, replicarea de la o singură origine pe un cromozom eucariot tipic ar dura zile întregi. Cu toate acestea, replicarea unui întreg genom eucariot are loc de obicei în doar câteva minute sau câteva ore.

Pentru a facilita sinteza rapidă a unor cantități mari de ADN, cromozomii eucarioți conțin origini multiple de replicare. Genomurile de drojdie conțin între 250 și 400 de origini, în timp ce genomurile de mamifere pot avea până la 25.000. Originile multiple sunt vizibile la microscopul electronic ca „ bule de replicare ” care se formează pe măsură ce helixul ADN -ului se desface , fiecare bulă oferind două furci de replicare potențiale (Figura 11.14).

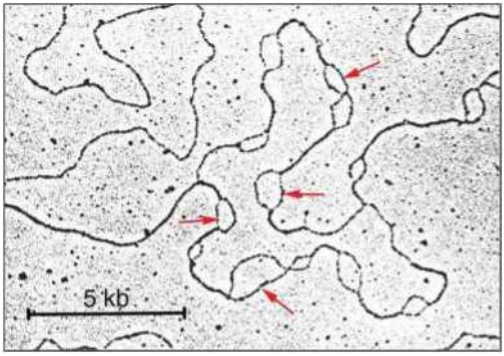


FIGURA 11.14 Demonstrația originilor multiple ale replicării de-a lungul unui cromozom eucariot. Fiecare origine poate fi văzută ca o bulă de replicare de-a lungul axei cromozomiale. Săgețile indică unele dintre aceste bule de replicare.

La drojdie, aceste origini, numite secvențe de replicare autonomă (ARS), constau din aproximativ 120 de perechi de baze care conțin o secvență consens (adică o secvență care este aceeași sau aproape aceeași în toate ARS-urile din drojdie) de 11 perechi de baze. Originile din celulele mamiferelor par să nu aibă nicio legătură cu secvențele lor specifice și pot fi definite în schimb prin structura cromatinei dintr - o regiune între 6 și 55 kb .

Originile replicării în organismele eucariote nu acționează doar ca situsuri de inițiere a replicării , ci controlează și momentul replicării ADN-ului. Aceste funcții de reglare sunt îndeplinite de un complex de mai multe proteine numit complex de pre-replicare (pre-RC), care se asamblează la originile replicării . În faza G1 timpurie a ciclului celular, originile replicării sunt recunoscute de un complex de șase proteine cunoscut sub numele de complex de recunoaștere a originii (ORC), care marchează originea ca situs de inițiere . De-a lungul fazei G1 a ciclului celular, alte proteine se asociază cu ORC pentru a forma pre -RC. Prezența unui pre-RC la o origine „permite” acea origine pentru replicare . Odată ce ADN polimerazele inițiază sinteza la origine , pre -RC se dezasambla și nu se reasamblează până în faza G1 a următorului ciclu celular . Acesta este un mecanism crucial , deoarece distinge între segmentele de ADN care au finalizat replicarea și cele compuse din ADN nereplicat , asigurând astfel o replicare ordonată și eficientă . Garantează că replicarea are loc o singură dată pentru fiecare fragment de ADN în timpul fiecărui ciclu celular .

Inițierea replicării ADN-ului este, de asemenea, reglată în regiunea de pre-replicare (pre-RC). O serie de kinaze ale ciclului celular care fosforilează proteinele de replicare, împreună cu helicaze care desfac ADN-ul, se asociază cu pre - RC și sunt esențiale pentru inițiere. Kinazele sunt activate în faza S , moment în care fosforilează alte proteine care declanșează începerea replicării ADN - ului . Rezultatul final este desfacerea ADN - ului la furcile de replicare , stabilizarea ADN - ului monocatenar , asocierea ADN- polimerazelor cu originile și inițierea sintezei ADN-ului .

Multiplele ADN polimeraze eucariote

Pentru a putea procesa numărul mai mare de repliconi existenți , celulele eucariote conțin mult mai multe molecule de ADN polimerază decât celulele bacteriene . De exemplu, o singură celulă de E. *coli* conține aproximativ

15 molecule de ADN polimerază III, în timp ce celulele mamiferelor conțin zeci de mii de molecule de ADN polimerază.

Organismele eucariote utilizează, de asemenea, un număr mai mare de tipuri de ADN polimeraze decât procariotele. Genomul uman conține gene care codifică cel puțin 14 ADN polimeraze distincte, dintre care doar trei sunt implicate în majoritatea replicării ADN-ului nuclear . Nomenclatura și caracteristicile acestor ADN polimeraze sunt rezumate în Tabelul 11.5.

Pol *a, 8* și e sunt principalele tipuri de enzime implicate în inițierea și elongarea în timpul sintezei ADN-ului nuclear eucariot, așa că ne vom concentra explicațiile asupra acestor polimeraze. Două dintre cele patru subunități ale enzimei Poi *a* Acestea sintetizează primeri de ARN atât pe catena principală, cât și pe cea întârziată. După ce primerul de ARN atinge o lungime de aproximativ 10 ribonucleotide, o altă subunitate adaugă între 20 și 30 de dezoxiribonucleotide complementare. Spunem că Pol *a are* procesivitate scăzută , termen care se referă la puterea asocierii dintre enzimă și substratul său și, prin urmare, la lungimea ADN -ului care este sintetizat înainte ca enzima să se disociază de șablon. Odată ce primerul este la locul său, are loc un eveniment cunoscut sub numele de mutație a polimerazei, în care Poi *a* se disociază de șablon și este înlocuit de Poi *8* și ε. Aceste enzime extind primerii pe catene de ADN opuse, au o procesivitate mult mai mare și prezintă activitate exonucleazică 3'-5', având astfel potențialul de a corecta erorile. Poi *E* sintetizează ADN pe catena principală, în timp ce Poi 8 îl sintetizează pe catena întârziată. Atât Poi 8, cât și Poie *participă* la alte evenimente de sinteză a ADN-ului în celulă , inclusiv diverse tipuri de reparare și recombinare a ADN-ului. Toate cele trei ADN polimeraze sunt esențiale pentru viabilitatea celulară .

Similar replicării ADN-ului procariot , etapele finale ale replicării ADN-ului eucariot implică înlocuirea primerilor ARN cu ADN și ligarea fragmentelor Okazaki la catena întârziată . La eucariote , fragmentele Okazaki sunt de aproximativ zece ori mai mici (100 până la 150 de nucleotide) decât la organismele procariote .

Printre enzimele rămase de replicare a ADN-ului se numără Poi , care se găsește doar în mitocondrii, sintetizând ADN-ul prezent în acea organită. ADN polimerazele sunt implicate în repararea și replicarea ADN- ului în acele regiuni ale șablonului de ADN care conțin deteriorări sau distorsiuni (un proces numit sinteză - translezională sau TLS). Deși aceste ADN polimeraze translezionale sunt mai puțin fiabile în copierea ADN-ului și, prin urmare , fac mai multe erori decât Pol a, 8 și y, ele sunt capabile să ocolească distorsiunile , lăsând goluri care pot fi reparate ulterior.

Replicarea prin cromatină

și cel procariot este că ADN-ul eucariot formează un complex cu proteinele care leagă ADN - ul , care există în celule sub formă *de cromatină.* După cum vom vedea în Capitolul 12, cromatina este compusă din unități care se repetă periodic , numite nucleozomi, fiecare dintre acestea fiind compus din aproximativ 200 de perechi de baze de ADN care formează un complex cu opt molecule de

TABLA 11.5 Propiedades de las ADN polimerasas eucarióticas

ADN polimerasa	Subunidades	3'-5* Exonucleasa	Función
a (alpha)	4	No	Cebadores de ARN/ADN, iniciación de la síntesis del ADN.
5 (delta)	4	Sí	Síntesis de la cadena retrasada, reparación del ADN, corrección de errores.
£ (épsilon)	4	Sí	Síntesis de la cadena adelantada, corrección de errores.
y (gamma)	2	Sí	Replicación y reparación del ADN mitocondrial.
0(beta)	1	No	Reparación del ADN por escisión de bases.
T) (eta)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
< (zeta)	2	No	Síntesis de ADN por translesión.
K(kappa)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
i (iota)	1	No	Síntesis de ADN por translesión.
0 (theta)	1	No	Reparación del ADN.
A (lambda)	1	No	Reparación del ADN.
ju. (mu)	1	No	Reparación del ADN.
p (nu)	1	No	Desconocida.
Rev 1	1	No	Reparación del ADN.

proteine histonice (Figura 11.15).
Înainte ca polimerazele să poată iniția sinteza , nucleozomii și alte proteine care leagă ADN-ul

trebuie îndepărtate sau modificate
într- un fel sau altul .

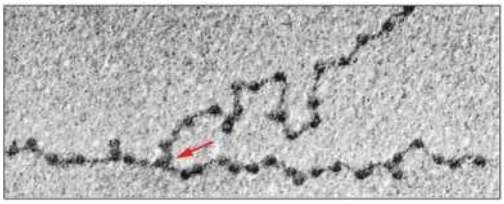


FIGURA 11.15 Micrografie electronică a unei furci de replicare eucariote, care arată prezența în ambele brațe a nucleozomilor care conțin proteine histonice.

ADN-ul pentru a face loc proteinelor de replicare. Pe măsură ce are loc sinteza ADN-ului, proteinele histonice și non-histonice trebuie să se reasociază rapid cu duplexurile nou formate, restabilind modelul caracteristic al nucleozomului.

Pentru a recrea cromatina nucleozomală în ADN-ul replicat, sinteza de noi proteine histonice este strâns cuplată cu sinteza ADN-ului în timpul fazei S a ciclului celular. Datele cercetărilor sugerează că nucleozomii se dezintegrează chiar înainte de furca de replicare și că proteinele histonice preexistente se pot asambla cu proteine histonice nou sintetizate pentru a forma noi nucleozomi. Noii nucleozomi se asamblează în spatele furcii de replicare , pe cele două catene de ADN fiice. Asamblarea de noi nucleozomi este realizată de factorii de asamblare ai cromatinei (CAF) care se mișcă odată cu furca de replicare.

11.7

Capetele cromozomilor liniari sunt problematice în timpul replicării

sinteza ADN-ului eucariot și procariot provine din diferențele structurale dintre cromozomii acestora. Spre deosebire de ADN-ul circular închis al bacteriilor și al majorității bacteriofagilor, cromozomii eucarioți sunt liniari. În timpul replicării, apare o problemă specială la capetele acestor molecule liniare.

Cromozomii eucarioți se termină cu secvențe distincte numite telomeri, care ajută la păstrarea integrității și stabilității cromozomilor. Telomerii sunt necesari deoarece „capetele" dublu catenare ale moleculelor de ADN de la capetele cromozomilor mai liniari sunt potențial predispuse la rupturi dublu *catenare* (DSB). Acestea pot apărea atunci când un cromozom se rupe intern . În astfel de cazuri, capetele libere ale catenei duble pot fuziona cu alte capete libere similare; dacă nu fuzionează , sunt vulnerabile la degradarea de către nucleaze. Ambele rezultate pot cauza probleme . Se crede că telomerii creează capete cromozomiale inerte, protejând cromozomii eucarioți intacți de fuziunea și degradarea necorespunzătoare .

Structura telomerilor

Am putea specula că trebuie să existe o caracteristică distinctivă în secvența de ADN sau în proteinele care se leagă de aceasta, care conferă telomerilor această proprietate protectoare . De fapt, s-a demonstrat că acesta este cazul. Elizabeth Blackburn și Joe Gall, în studiul lor asupra micronucleilor - cel mai mic dintre cei doi nuclei din protozoarul ciliat *Tetrahymena* - au fost primii care au descoperit că ADN-ul de la capetele cromozomului protozoarului este compus dintr-o secvență scurtă , repetată în tandem , TTGGGG. Această secvență este prezentă de multe ori într-una dintre cele două catene elicoidale care formează fiecare telomer. Această catenă se numește catena bogată în G , spre deosebire de catena sa complementară, numită catena bogată în C, în care secvența AACCCCC apare în mod repetat . În mod similar, toate vertebratele conțin secvența TTAGGG la capetele catenelor lor bogate în G , repetată de câteva mii de ori în celulele somatice. Deoarece fiecare cromozom liniar se termină cu două catene de ADN elicoidale care se desfășoară antiparalel una față de cealaltă, o catenă are un capăt 3' , iar cealaltă un capăt 5' . Catena bogată în G este catena 3'. Acest lucru este deosebit de important în timpul replicării telomerilor .

Dar mai întâi, să descriem de ce această secvență repetitivă de ADN face ca capetele cromozomilor să fie inerte. Un model se bazează pe descoperirea faptului că catena bogată în G care se termină în 3' se extinde ca un lanț suspendat, lipsit de complement , formând astfel o coadă monocatenară la capătul fiecărui telomer. La *Tetrahymena,* această coadă are doar 12 până la 16 nucleotide lungime ; cu toate acestea , la vertebrate, poate avea câteva sute de nucleotide lungime . Cercetătorii au legat conformația finală a acestor cozi de natura inertă a cromozomilor . Deși nu pot fi considerate complementare în același mod în care sunt perechile de baze AT și CG , nucleotidele care conțin G sunt totuși capabile să formeze perechi de baze între ele atunci când mai multe dintre ele se aliniază cu fața spre o altă secvență bogată în G. În acest fel, cozile monocatenare bogate în G sunt capabile să

se bucleze înapoi pe ele însele , creând multiple legături de hidrogen GG, pentru a forma ceea ce sunt cunoscute sub numele de cvartete G. Buclele rezultate la capetele cromozomului (numite bucle T) seamănă oarecum cu cele create la legarea șireturilor. Se crede că aceste structuri, în combinație cu proteine specifice care se leagă de ele, sigilează practic capetele cromozomilor , făcându-i inerți.

Replicarea la nivelul telomerului

Să luăm acum în considerare problema reprezentată de replicarea semiconservativă la capătul unei molecule de ADN bicatenar . Deși sinteza 5'-3' pe matrița catenei conducătoare poate continua până la capăt, apare o dificultate la catena întârziată la îndepărtarea primerului terminal de ARN (Figura 11.16).

În mod normal, golul nou creat ar fi umplut prin adăugarea unui nucleotid la gruparea 3'-OH adiacentă [gruparea din dreapta golului (a) din Figura 11.16]. Cu toate acestea, deoarece golul final [golul (b) din Figura 11.16] se află la capătul catenei întârziate , nu există niciun fragment Okazaki prezent pentru a furniza gruparea 3'-OH necesară. Prin urmare, în situația prezentată în Figura 11.16, un gol va rămâne în catena întârziată produsă în fiecare ciclu succesiv de sinteză, scurtând capătul dublu catenar al cromozomului cu o lungime echivalentă cu cea a primerului ARN . Cu fiecare ciclu de replicare , această scurtare devine mai severă în fiecare celulă fiică, *extinzându-se potențial dincolo de telomer, ceea ce deschide posibilitatea ștergerii regiunilor care codifică gene.*

O enzimă eucariotă foarte specială numită telomerază, descoperită pentru prima dată de Elizabeth Blackburn și Carol Greider în timp ce studiau *Tetrahymena* , ne-a ajutat să înțelegem soluția la problema scurtării telomerilor. După cum am mai spus, ADN-ul telomeric din eucariote este întotdeauna compus din multe secvențe scurte și repetate de nucleotide, catena bogată în G atârnând ca o coadă monocatenară . La *Tetrahymena,* coada conține mai multe repetiții ale secvenței 5'-TT-GGGG-3'. După cum vom vedea, telomeraza este capabilă să adauge mai multe repetiții suplimentare ale acestei secvențe de șase nucleotide la capătul 3' al catenei bogate în G (folosind sinteza 5'-3'). Investigațiile detaliate efectuate de Blackburn și Greider asupra modului în care enzima telomerază *din Tetrahymena* efectuează această sinteză au condus la o descoperire extraordinară. Este o enzimă foarte atipică, prin faptul că este o *ribonucleoproteină,* a cărei structură moleculară conține un fragment scurt de ARN esențial pentru activitatea sa catalitică. Componenta ARN servește...

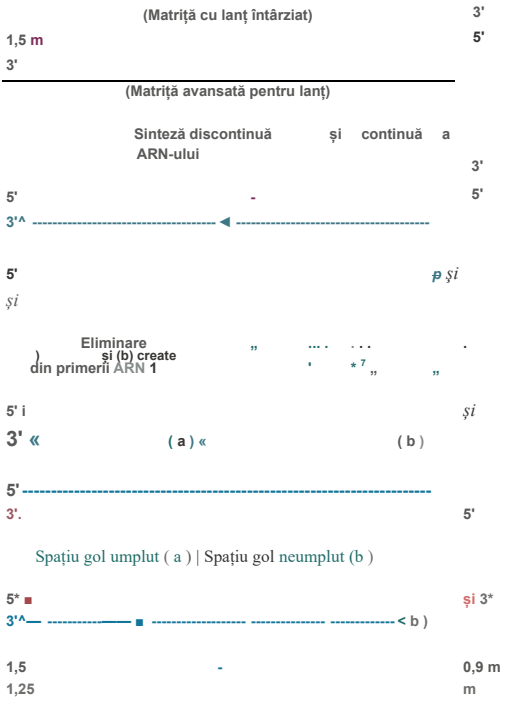


FIGURA 11.16 Schemă care ilustrează dificultatea întâmpinată în timpul replicării capetelor cromozomilor liniari . Un gol (b) rămâne după sinteza catenei întârziate .

Acesta servește atât ca „ghid" (pentru a lega corect enzima de telomer), cât și ca „șablon" pentru sinteza complementului său de ADN, acesta din urmă fiind un proces numit transcripție inversă. La *Tetrahymena,* ARN-ul conține secvența AACCCCAAC, în cadrul căreia se află secvența complementară a ADN-ului telomeric repetat care trebuie sintetizat (TTGGGG).

Figura 11.17 prezintă un model al modului în care cercetătorii cred că funcționează enzima. O parte din secvența de ARN a enzimei (prezentată cu verde) se împerechează bază cu secvența terminală a ADN-ului monocatenar suspendat, în timp ce restul ARN-ului se extinde dincolo de porțiunea suspendată. Transcripția inversă - adică sinteza ADN-ului dintr-un șablon de ARN - a acestei secvențe de ARN rămase extinde apoi lungimea catenei suspendate bogate în G. Se crede apoi că enzima se translocă la capătul (nou format) al catenei.

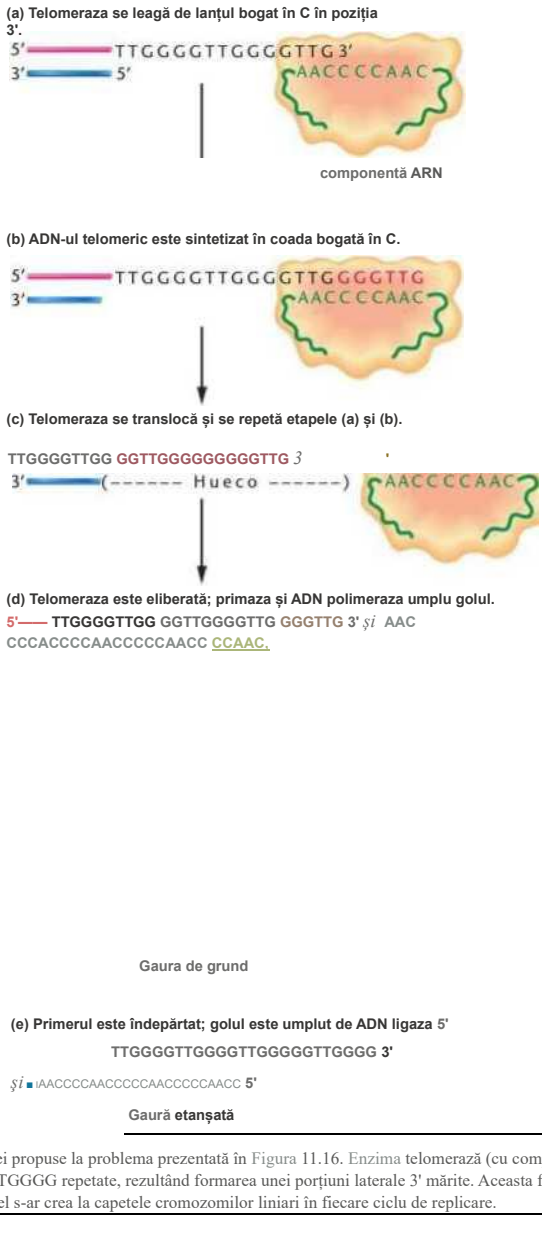

(a) Telomeraza se leagă de lanțul bogat în C în poziția 3'.
5' TTGGGGTTGGGGTTG 3'
3' 5'
AACCCCAAC
componentă ARN
(b) ADN-ul telomeric este sintetizat în coada bogată în C.
5' TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTG
3'
AACCCCAAC
(c) Telomeraza se translocă și se repetă etapele (a) și (b).
TTGGGGTTGG GGTTGGGGGGGGGTTG 3
3' (------ Hueco ------)
AACCCCAAC
(d) Telomeraza este eliberată; primaza și ADN polimeraza umplu golul.
5'—— TTGGGGTTGG GGTTGGGGTTG GGGTTG 3' și AAC
CCCACCCCAACCCCCAACC CCAAC.
Gaura de grund
(e) Primerul este îndepărtat; golul este umplut de ADN ligaza 5'
TTGGGGTTGGGGTTGGGGGTTGGGG 3'
și IAACCCCAACCCCCAACCCCCAACC 5'
Gaură etanșată

FIGURA 11.17 Schema soluției propuse la problema prezentată în Figura 11.16. Enzima telomerază (cu componenta sa ARN reprezentată în verde) dirijează sinteza secvențelor TTGGGG repetate, rezultând formarea unei porțiuni laterale 3' mărite. Aceasta facilitează sinteza ADN-ului pe catena opusă, umplând golul care altfel s-ar crea la capetele cromozomilor liniari în fiecare ciclu de replicare.

ca aceleași evenimente să se repete, continuând procesul de expansiune.

a ADN-ului are loc folosind porțiunea suspendată ca șablon, implicând primaza, ADN polimeraza și ADN ligaza, cea mai mare parte a golului inițial va fi umplută [Figura 1.17 (d) și (e)]. Când primaza este îndepărtată, rămâne un mic gol . Cu toate acestea, acest gol este acum mult dincolo de capătul original al cromozomului, prevenind astfel scurtarea. Un alt model sugerează că extensia de ADN creată de telomerază facilitează sinteza ADN-ului pe catena opusă, bogată în carbon . În acest model, extensia monocatenară se înfășoară înapoi pe ea însăși , furnizând gruparea 3'- OH necesară pentru inițierea sintezei necesare pentru umplerea golului .

Până în prezent, funcția telomerazei a fost descoperită în toate organismele eucariote studiate. După cum vom vedea în Capitolul 12, secvențele de ADN telomeric au fost extrem de conservate de-a lungul evoluției, reflectând funcția critică a telomerilor. Așa cum am menționat anterior, la oameni,

secvența de ADN telomerică care generează catena repetitivă, întârziată, este 5'-TTAGGG-3', care diferă de cea a *Tetrahymena* printr-un singur nucleotid.

În majoritatea celulelor eucariote somatice, telomeraza este inactivă, așadar, odată cu fiecare diviziune celulară, telomerii fiecărui cromozom se scurtează. După multe diviziuni, telomerul poate fi grav erodat, determinând celula să piardă capacitatea de a se diviza în continuare. Celulele maligne, pe de altă parte, mențin activitatea telomerazei și astfel ating nemurirea. În secțiunea „Genetică, tehnologie și societate" de la sfârșitul capitolului, vom vedea că scurtarea telomerilor, din cauza absenței telomerazei în celulele somatice, a fost asociată cu un mecanism molecular implicat în îmbătrânirea celulară.

11.8

Recombinarea ADN-ului, la fel ca replicarea ADN-ului, este dirijată de enzime specifice

Ne vom îndrepta acum atenția către un subiect pe care l-am abordat deja în Capitolul 5 - recombinarea genetică. Acolo, am observat că procesul de încrucișare între omologi depinde de ruperea și unirea lanțurilor de ADN, rezultând schimbul de informații genetice între moleculele de ADN . Acum, că am examinat chimia ADN-ului și replicarea acestuia, putem lua în considerare modul în care are loc recombinarea la nivel molecular. În general, următoarele informații se referă la schimbul genetic dintre două molecule omoloage de ADN dublu catenar , inclusiv cromozomii virali și bacterieni, precum și omologii eucarioți, în timpul meiozei. Schimbul genetic la poziții echivalente de-a lungul a doi cromozomi cu omologie substanțială în secvența lor de ADN se numește recombinare generalizată sau omoloagă .

Mai multe modele încearcă să explice recombinarea omoloagă și toate au câteva caracteristici comune. În primul rând, toate se bazează pe propunerile inițiale prezentate independent de Robin Holliday și Harold L.K. Whitehouse în 1964. În al doilea rând, toate se bazează pe complementaritatea dintre lanțurile de ADN pentru a explica acuratețea schimbului . În cele din urmă, fiecare model include o serie de procese enzimatice pentru a efectua recombinarea genetică.

Un astfel de model este prezentat în Figura 11.18. Acesta începe cu două duplexuri de ADN pereche sau omoloage [Etapa (a)], în fiecare dintre acestea o endonuclează introduce o tăietură într-una dintre catene în poziții identice [Etapa (b)]. Capetele interne ale catenei produse de aceste tăieturi sunt deplasate și ulterior împerecheate cu complementele lor din duplexul opus [Etapa (c)]. O ligază sigilează apoi capetele libere [Etapa (d)], formând duplexuri hibride numite molecule de ADN heteroduplex, care sunt ținute împreună de o structură încrucișată. Poziția acestei structuri încrucișate poate fi apoi deplasată de-a lungul cromozomului printr-un proces numit deplasare încrucișată [Etapa (e)] , care are loc ca urmare a unui efect de fermoar, deoarece legăturile de hidrogen sunt rupte și apoi reformate între bazele complementare ale catenelor deplasate în fiecare buclă. Această migrare produce o creștere a lungimii ADN-ului heteroduplex la ambii omologi.

Dacă duplexurile sunt pliate [Pasul (f)j], iar partea inferioară prezentată în figură este rotită cu 180° [Pasul (g)], se formează o structură intermediară plată numită în formă *de x.* (ji) —sau este structura Holliday. Dacă acum o endonuclează taie cele două catene în omologi opuși care nu au fost implicați anterior în schimb [Etapa (h)] și ligatura are loc ca în [Etapa (i)], se creează două duplexuri de recombinare . Rețineți că aranjamentul alelelor este modificat ca urmare a acestei recombinări.

Întrucât modelul anterior implică *întreruperi ale unui singur lanț ,* Au fost propuse și alte modele *de* recombinare care implică *rupturi dublu* catenare într -una dintre dublurile spirale ale ADN-ului . În aceste modele, endonucleazele elimină nucleotidele la punctul de ruptură, creând catene suspendate 3' pe fiecare catenă. Una dintre catenele rupte invadează dubla spirală intactă a celuilalt omolog , iar ambele catene se aliniază cu omologul intact . Apoi, procesul de sinteză a reparării ADN-ului umple toate golurile și se formează două joncțiuni Holliday . O serie de separări și ligări de către nuclează completează schimbul. Rezultatul final este același ca în modelul nostru original: schimbul genetic are loc în timpul încrucișării în tetradele meiotice. Se crede că un mecanism similar are loc atunci când celulele repară rupturile dublei catene din cromozomi. Astfel de daune pot apărea din numeroase cauze, inclusiv radiațiile ionizante . Vom discuta din nou acest subiect în Capitolul 15.

Ca și în cazul replicarii ADN-ului, procesele implicate în recombinarea ADN-ului necesită activitatea a numeroase enzime și a altor proteine. Mutațiile genelor care codifică aceste proteine pot cauza defecte în recombinare , precum și în repararea și replicarea ADN - ului . Una dintre proteinele cheie implicate în recombinare la E. *coli* Este proteina RecA. Această moleculă promovează schimbul de molecule de ADN monocatenare reciproce , cum ar fi

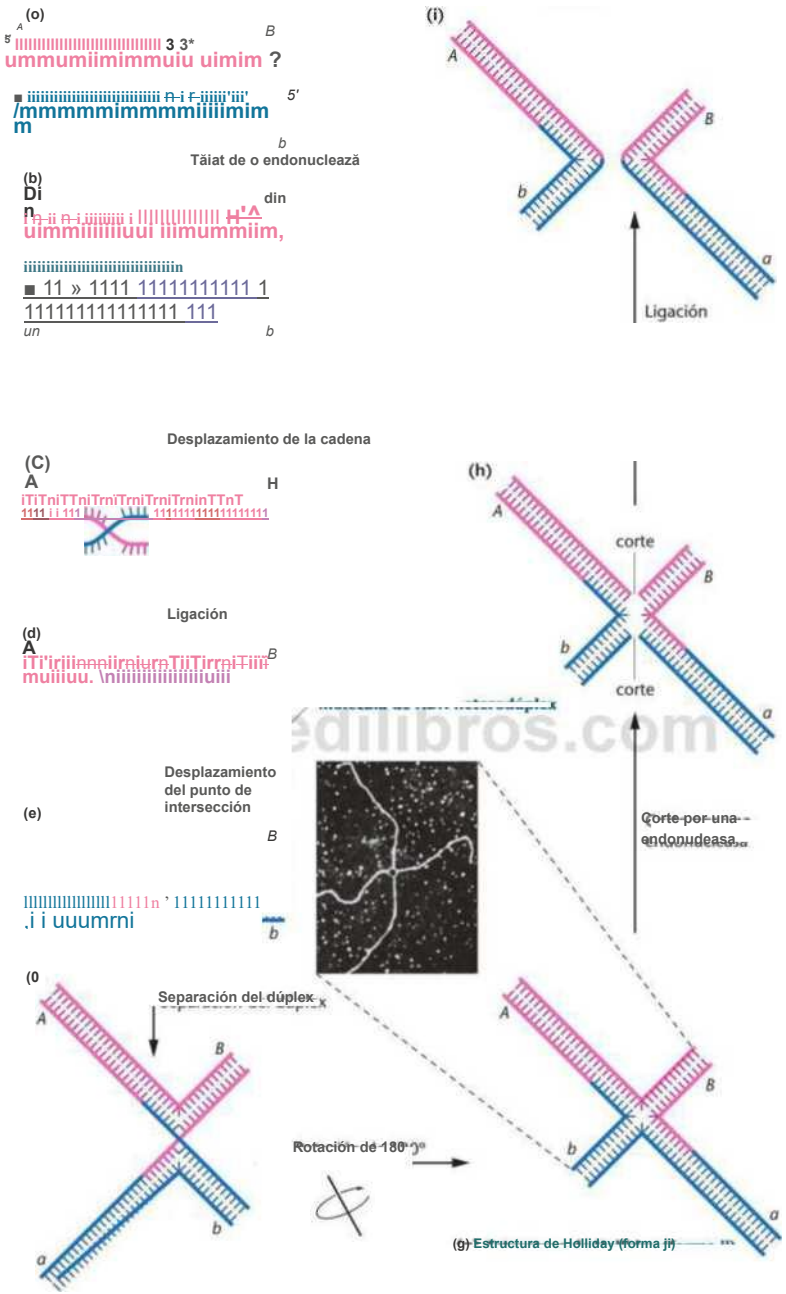

(o)
A
B
5
3 3*
ummumiimimmuiu uimim ?
5'
/mmmmmimmmmiiiiimim
m
b
Tăiat de o endonuclează
(b)
Di
n
din
uimmiiiiiiiuui iiimummiim,
11 » 1111 11111111111 1
111111111111111 111
un
b
(i)
A
B
b
a
Ligación
Desplazamiento de la cadena
(C)
A
H
iTiTniTTniTrniTrniTrniTrninTTnT
1111 i i 111
111111111111111111
Ligación
(d)
A
B
iTi'iriiinnniirniurnTiiTirrniTiiii
muiiiuu. \niiiiiiiiiiiiiiiiiiiii
Desplazamiento
del punto de
intersección
(e)
B
11111n ' 11111111111
.i i uuumrni
b
(h)
A
corte
B
b
corte
a
Corte por una
endonudeasa
Separación del dúplex
A
B
b
a
Rotación de 180 °
A
B
b
a
(g) Estructura de Holliday (forma ji)

FIGURA 11.18 Model care ilustrează modul în care are loc recombinarea genetică ca urmare a ruperii şi unirii catenelor de ADN heteroloage. Fiecare etapă este descrisă în text. Micrografia electronică prezintă ADN cu o structură în formă de *Y* similară cu cea din diagrama (g); ADN-ul are o structură Holliday extinsă, obţinută din plasmida Co/E1 a *E. coli*. *David Dressier, Universitatea Oxford, Anglia.*

Acest lucru se întâmplă în Etapa (c) a modelului. În plus, RecA amplifică, de asemenea, formarea legăturilor de hidrogen în timpul deplasării catenei , inițiind astfel formarea heteroduplexului. Proteinele RecB, RecC și RecD pot separa catenele de ADN și pot ajuta la derularea duplexului. Alte proteine sunt implicate în deplasarea punctului de intersecție și în rezoluția structurilor Holliday . Proteinele de replicare a ADN-ului , cum ar fi ADN polimerazele, ADN ligaza, girazele și proteinele de legare a unei singure catene, sunt , de asemenea, implicate în recombinarea și repararea ADN-ului .

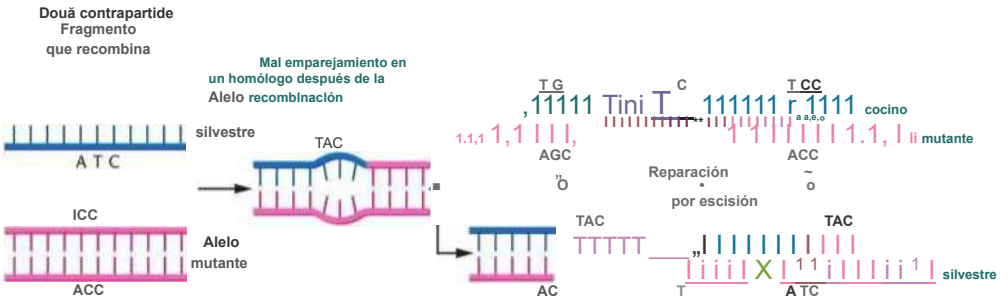
Conversia genetică, o consecință a recombinării ADN-ului

O modificare a modelului anterior ne-a ajutat să înțelegem mai bine un fenomen genetic special, cunoscut sub numele de conversie genetică. Inițial descoperită la drojdii de către Carl Lindegren și la *Neurospora* de către Mary Mitchell , conversia genetică este caracterizată printr -un schimb genetic nereciproc între două gene strâns legate . De exemplu, dacă am încrucișa două tulpini de *Neurospora* , fiecare purtând o mutație diferită (a+ X *+b),* recombinarea *reciprocă* dintre gene ar produce perechi de spori cu genotipurile *++ și ab.* Cu toate acestea , un schimb nereciproc produce doar o pereche, fără cealaltă . Lucrând cu mutanți de piridoxină, Mitchell a observat mai multe tulpini care conțin perechi de spori cu genotipul ++ , dar nu cu produsul reciproc (ab). Deoarece frecvența acestor evenimente a fost mai mare decât rata de mutație prezisă și, prin urmare, nu a putut fi explicată prin mutație, ele au fost numite *conversii genetice.* Au fost numite astfel deoarece se părea că, cumva , o alelă s-a „convertit" în alta, având loc și un schimb genetic . Descoperiri similare au fost făcute la studierea altor ciuperci.

Conversia genică este considerată în prezent o consecință a recombinării ADN-ului. O posibilă explicație este interpretarea conversiei ca o nepotrivire a perechilor de baze în timpul formării heteroduplexului, așa cum se arată în Figura 1.19. Regiunile nepotrivite ale catenelor hibride pot fi reparate prin excizarea unei catene și sintetizarea catenei complementare folosind catena rămasă ca șablon . Excizia poate avea loc pe oricare catenă , producând două „ corecții " posibile . Una repară perechea de baze nepotrivită și o „ convertește " pentru a restabili secvența originală . Cealaltă corectează , de asemenea , nepotrivirea , dar o face prin copierea catenei modificate , creând o substituție a perechilor de baze . Conversia poate avea efectul creării de alele identice la doi omologi care erau inițial diferiți .

În exemplul din Figura 11.19, să presupunem că perechea G= C a unuia dintre cei doi omologi corespunde alelei mutante , în timp ce perechea A= T face parte din secvența genetică de tip sălbatic a celuilalt omolog. Conversia perechii G= C în A= T ar avea efectul de a schimba alelele mutante în tipul sălbatic , exact așa cum a observat Mitchell.

Conversia genetică a ajutat la explicarea altor fenomene genetice enigmatice la ciuperci . De exemplu.



Când se studiază alelele mutante și de tip sălbatic ale unei singure gene într-o încrucișare, sporii rezultați ar trebui să producă un număr egal de spori de tip sălbatic și mutanți. Cu toate acestea, uneori se observă spori excepționali cu raporturi de 3:1 sau 1:3. Aceste raporturi sunt înțelese în termeni de conversie genică. Acest fenomen a fost detectat și în timpul proceselor mitotice la fungi, precum și în studiul cromozomilor compoziți speciali la *Drosophila* .

Conversia genică poate avea loc și în celulele somatice în timpul procesului de reparare a rupturilor dublu catenare din ADN , așa cum se explică în Capitolul 15. Când structura ambelor catene ale unei molecule de ADN este ruptă, catenele deteriorate sunt degradate la locurile de ruptură și reparate prin conversie genică, utilizând informații găsite într-o moleculă de ADN omoloagă. Aceste informații sunt copiate pentru a înlocui porțiunea degradată a ADN-ului deteriorat.

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

Telomerii: cheia nemuririi?

Oamenii, la fel ca toate organismele multicelulare, îmbătrânesc și mor. Odată cu vârsta, sistemul imunitar devine mai puțin eficient, vindecarea rănilor este afectată, iar țesuturile și organele își pierd flexibilitatea. De ce pierdem abilități odată cu vârsta și de ce fiecare specie are un ciclu de viață finit caracteristic a fost întotdeauna un mister. De ce îmbătrânim? Putem schimba cursul mortalității? Unele descoperiri recente sugerează că răspunsul la aceste întrebări s-ar putea afla la capetele cromozomilor.

Studiul îmbătrânirii umane nu începe cu studiul celulelor umane în vase de cultură. La fel ca organismele din care au fost obținute aceste celule, celulele cultivate au, de asemenea, o durată de viață finită. *Senescența replicativă* **a fost observată pentru prima dată de Leonard Hayflick în anii 1960. El a publicat că fibroblastele umane normale își pierd capacitatea de a crește și de a se diviza după aproximativ 50 de diviziuni celulare. Aceste celule senescente rămân active metabolic, dar nu mai pot continua să prolifereze. În timp, ele mor. Deși nu știm dacă senescența celulară provoacă direct îmbătrânirea organismelor, dovezile disponibile sugerează că da. De exemplu, celulele de la tineri suferă mai multe diviziuni decât celulele de la persoanele în vârstă; celulele de la speciile cu o durată de viață scurtă încetează să crească după mai puține diviziuni decât cele de la speciile cu o durată de viață mai lungă ; iar celulele pacienților cu sindroame de îmbătrânire prematură experimentează mai puține diviziuni decât cele ale pacienților normali .**

O altă caracteristică a îmbătrânirii celulare implică telomerii. În majoritatea celulelor somatice ale mamiferelor , telomerii se scurtează odată cu replicarea ADN-ului , deoarece ADN polimeraza nu poate sintetiza ADN nou la capetele fiecărei catene parentale. Cu toate acestea , așa cum se discută în detaliu în acest capitol , celulele care suferă o proliferare excesivă, cum ar fi celulele embrionare , celulele germinale și celulele stem adulte , își mențin lungimea telomerilor folosind telomerază - o enzimă remarcabilă care conține ARN și care adaugă secvențe de ADN telomeric la capetele cromozomilor liniari . Majoritatea celulelor somatice din organismele adulte , însă , nu proliferează și, prin urmare, nu conțin telomerază activă.

Putem obține tinerețe și vitalitate perpetuă prin creșterea lungimii telomerilor noștri ? Unele studii sugerează că ar putea fi posibilă inversarea procesului de senescență prin creșterea artificială a cantității de telomerază din celulele noastre. Atunci când cercetătorii au introdus gene clonate de telomerază în celule umane normale , aflate în cultură, telomerii s-au lungit , iar celulele au continuat să crească mult dincolo de punctul lor de senescență . Aceste studii sugerează că o parte din atrofia tisulară asociată cu îmbătrânirea ar putea fi inversată prin activarea genelor telomerazei . Cu toate acestea, înainte de a utiliza telomeraza pentru a obține nemurirea , trebuie să luăm în considerare un efect secundar potențial grav: cancerul.

Deși celulele normale prezintă scurtarea telomerilor și senescență după un anumit număr de diviziuni celulare , celulele canceroase nu . Peste 80 % din celulele tumorale umane prezintă activitate telomerazică , își mențin telomerii și ating nemurirea. Cele care nu conțin telomerază activă utilizează un mecanism încă puțin înțeles , cunoscut sub numele de ALT (*alungirea* **alternativă a telomerilor).**

Aceste observații i -au determinat pe oamenii de știință să dezvolte noi terapii împotriva cancerului, bazate pe ideea că agenții inhibitori ai telomerazei pot distruge celulele canceroase permițând scurtarea telomerilor , forțând astfel celulele să intre în senescență . Deoarece majoritatea celulelor umane normale

nu **exprimă** telomerază , o astfel de terapie ar viza în mod specific celulele tumorale și ar fi mai puțin toxică decât majoritatea medicamentelor anticancerigene actuale . Multe astfel de medicamente antitelomerazice sunt în prezent în curs de dezvoltare , iar unele sunt deja în studii clinice .

Dacă vom dobândi o mai bună înțelegere a telomerilor , ne va permite acest lucru să luptăm împotriva cancerului și să inversăm progresia spre îmbătrânire? Timpul va spune.

Rândul tău

I. Acordați-vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a încerca să înțelegeți unele dintre cercetările efectuate asupra telomerilor, îmbătrânirii și cancerului.

1. Cum am putea aplica cunoștințele noastre despre telomeri și telomerază strategiilor anti-îmbătrânire ? Sunt dezvoltate în prezent astfel de strategii sau terapii?

Puteți obține surse relevante de informații utilizând site-ul web PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db-PubMed).

2. Un medicament antitelomerazic, denumit GRN163L, este dezvoltat de Geron Corporation ca tratament împotriva cancerului. Cum funcționează GRN163L? Care este stadiul actual al studiilor clinice pentru GRN163L? Care sunt unele dintre potențialele efecte secundare ale medicamentelor antitelomerazice?

Puteți citi despre acest medicament și studiile sale clinice pe site-ul Geron la adresa http://www.geron.com . Căutați pe PubMed articole științifice care discută efectele anticancerigene ale GRN163L.

3. Persoanele care suferă de stres cronic par să aibă mai multe probleme de sănătate și să îmbătrânească prematur. Există dovezi că stresul cronic, sănătatea precară și lungimea telomerilor sunt corelate? Cum ar putea stresul să afecteze lungimea telomerilor sau invers?

Unele articole recente sugerează cum ar putea fi legate aceste fenomene. Un astfel de articol este Epel, E. S., și colab. 2004. Scurtarea accelerată a telomerilor ca răspuns la stresul vieții. *Proc. Natl. Academic Sa. SUA* 101(49): 17312-17315.

4. În 2006, Premiul Lasker pentru cercetare medicală fundamentală a fost acordat doctorilor Elizabeth Blackburn, Carol Greider și Jack Szostak, care au primit ulterior Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 2009. Cum a dus convergența oamenilor, ideilor și norocul la descoperirea telomerazei și a rolului acesteia în îmbătrânire și cancer ? Care este viitorul acestei cercetări ?

Ascultați interviuri cu acești oameni de știință în care povestesc despre cercetarea lor și direcția în care văd ei că se îndreaptă acest domeniu științific . http://www.laskerfoundation.org/2006videoawards .

P. STUDIU DE CAZ | Timpul este totul

Un cercetător a fost întrebat dacă munca sa privind controlul genetic al replicării telomerilor la oameni este legată de vreun fel de tulburare genetică. El a răspuns că s-ar putea crede că orice mutație care afectează replicarea ar fi letală în timpul dezvoltării timpurii și, prin urmare, indisponibilă pentru studiu . Dar realitatea este că, de fapt, cunoaștem o tulburare genetică umană rară care afectează telomerii . Această tulburare , diskeratoza congenitală (DKC), este asociată cu mutații în subunitățile proteice ale telomerazei , enzima responsabilă de replicarea capetelor cromozomilor eucarioți. Simptomele inițiale apar în țesuturile derivate din celule care se divid rapid, inclusiv pielea, unghiile și măduva osoasă și afectează mai întâi copiii cu vârste cuprinse între 5 și 15 ani.

Această tulburare ridică câteva întrebări interesante:

1. Cum pot supraviețui acei oameni?
2. De ce sunt afectate inițial țesuturile derivate din celule care se dividesc rapid?
3. Este posibil ca această tulburare să afecteze durata de viață a celor care suferă de ea ?
4. Ați spune că mutațiile din componenta ARN a telomerazei pot cauza , de asemenea, DKC?

Puncte de rezumat

I. În 1958, Meselson și Stahl au rezolvat întrebarea despre care dintre cele trei moduri potențiale de replicare este utilizat de E. *coli* în timpul duplicării ADN-ului , optând în favoarea replicării semiconservative, demonstrând că ADN-ul nou sintetizat este alcătuit dintr -o catenă veche și o catenă nouă.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

2. Taylor, Woods și Hughes au demonstrat replicarea semiconservativă a organismelor eucariote folosind meristemele rădăcinii de fasole ca sursă de celule care se divizează.
3. Arthur Kornberg a izolat enzima ADN polimerază I din *E. coli* și a demonstrat că aceasta este capabilă să dirijeze sinteza ADN-ului *in vitro, cu condiția să fie*

furnizate o matriță și precursori nucleozidici trifosfați .

4. Descoperirea ulterioară a tulpinii mutante *polA1* de *E. coli,* care putea replica ADN-ul în ciuda lipsei de activitate a polimerazei I, a ridicat întrebări cu privire la rolul acestei enzime în replicarea in vivo . Polimeraza III a fost identificată *ulterior ca enzima responsabilă* de replicarea ADN-ului *in vivo.*
5. sintezei ADN-ului , dubla spirală se desface, formând o furcă de replicare unde începe sinteza . Proteinele stabilizează spirala desfăcută și ajută la ameliorarea tensiunii de înfășurare care apare dincolo de furca de replicare.
6. Sinteza ADN-ului este inițiată în situsuri specifice de pe fiecare catenă șablon de către enzima primază, rezultând segmente scurte de ARN care oferă capete 3' adecvate pentru ca ADN polimeraza III să își înceapă sarcina de polimerizare .
7. Sinteza concomitentă a ADN-ului are loc continuu pe catena conducătoare și discontinuu pe catena întârziată opusă, rezultând fragmente Okazaki scurte care sunt ulterior unite prin ADN ligază.
8. Replicarea ADN-ului în organismele eucariote este mai complexă decât în organismele procariote, utilizând multiple origini de replicare, multiple tipuri de ADN polimeraze și factori care descompun și asamblează cromatina nucleozomală.
9. Replicarea la capetele cromozomilor liniari la eucariote prezintă o problemă specială care poate fi rezolvată prin prezența telomerilor și de o enzimă caracteristică ce conține ARN și se numește telomerază.
10. Recombinarea omoloagă între moleculele de ADN depinde de alinierea exactă a omologilor și de acțiunea unei serii de enzime care pot tăia, realinia și resigila lanțurile de ADN.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Preziceți rezultatele teoretice ale modelelor conservativ și dispersiv de replicare a ADN-ului în condițiile experimentului Meselson-Stahl. Folosind următorul model de sedimentare, stabiliți rezultatele pentru două generații de replicare după transferul celulelor într-un mediu care conține *N:

Densitate -

^{0,4} N/ ^{0,4} N ^{0,5} N/ ^{0,4} N ^{15} N/' ^{5} N

Soluție:

Replicare conservatoare
Replicare dispersivă

2. Mutații în gena *dnaA* a *E. coli* Aceste mutații sunt letale și pot fi studiate doar prin izolarea mutațiilor condiționate sensibile la temperatură . Astfel de tulpini mutante cresc și se replică ușor la temperatura permisă de 18°C, dar nu își cresc sau nu își replică ADN-ul la temperatura restrictivă de 37°C. Două observații au fost utile în determinarea funcției produsului proteic DnaA. În primul rând , studiile *in vitro* care utilizează șabloane de ADN necrocolate nu necesită proteina DnaA. În al doilea rând, dacă celulele intacte sunt cultivate la 18°C și apoi transferate la 37°C, sinteza ADN-ului continuă la această temperatură până când un ciclu de replicare este finalizat , apoi se oprește . Ce sugerează aceste observații despre funcția produsului genetic dnaA ?

Soluție. La 18 °C (temperatura permisivă), mutația nu este exprimată și începe sinteza ADN-ului . După schimbarea la temperatura restrictivă, sinteza ADN-ului care a început deja continuă , dar nu poate începe nicio nouă sinteză. Deoarece proteina DnaA nu este necesară pentru sinteza ADN-ului necolaminat , aceste observații sugerează că, *in vivo,* proteina DnaA joacă un rol esențial în sinteza ADN-ului prin interacțiunea cu helixul intact și prin facilitarea cumva a denaturării localizate necesare pentru continuarea sintezei .

Probleme și întrebări pentru discuții

DE CUM ȘTIM

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care se replică și se sintetizează ADN-ul. De asemenea, am discutat despre recombinarea la nivel de ADN și despre fenomenul conversiei genice. Pe parcurs, am întâlnit numeroase ocazii de a analiza modul în care au fost dobândite aceste informații. Având în vedere aceste explicații, ce răspunsuri ați propune la următoarele întrebări fundamentale?

(a) Care este baza experimentală pentru a concluziona că ADN-ul se replică semiconservativ atât în organismele eucariote, cât și în cele procariote ?

(b) sinteza ADN-ului are loc sub conducerea ADN polimerazei III și nu sub cea a ADN polimerazei I?

(c) De unde știm că sinteza ADN-ului *in vivo* are loc în direcția 5'-3'?

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor , consultați www.masteringgenetics.com

(d) De unde știm că sinteza ADN-ului este discontinuă pe una dintre cele două catene matriță?

(e) Ce observații arată că există o „problemă a telomerilor " în timpul replicării ADN-ului eucariot și cum am descoperit soluția la această problemă?

2. Comparați modelele conservativ, semiconservativ și dispersiv de - replicare a ADN-ului .
3. Descrieți rolul lui ^{15}N în experimentul Meselson- Stahl.
4. Preziceți rezultatele experimentului Taylor, Woods și Hughes dacă replicarea ar fi (a) conservativă și (b) dispersivă .
5. Reconsiderați problema 30 din capitolul 10. În modelul propus, ar fi putut molecula să fie replicată semiconservativ? De ce? Ar putea funcționa și alte modele de replicare ?
6. Care sunt cerințele pentru sinteza ADN-ului *in vitro* sub conducerea ADN polimerazei I?
7. În primele experimente ale lui Kornberg , se zvonea că a crescut *E. coli* în rezervoare mari cu bere Anheuser -Busch (lucra la Universitatea Washington din St. Louis) . De ce credeți că l-a ajutat acest lucru în cercetările sale asupra polimerazei I ?
8. Cum a verificat Kornberg fidelitatea replicării ADN -ului de către polimeraza I?
9. Ce caracteristici ale ADN polimerazei I au ridicat la îndoială dacă funcția sa *in vivo* era sinteza ADN - ului care duce la replicarea sa completă?
10. Kornberg a arătat că nucleotidele sunt adăugate la capătul 3' al fiecărei catene de ADN în creștere . Cum participă fiecare grupare OH 3' expusă la alungirea lanțului ?
11. Care *a* fost semnificația mutației *polA1 ?*
12. Rezumați și comparați proprietățile ADN polimerazelor I, II și III.
13. Enumerați și descrieți funcția celor 10 subunități care alcătuiesc ADN polimeraza III. Faceți distincția între holoenzimă și nucleul enzimatic.
14. Distingeți între (a) sinteza unidirecțională și bidirecțională a ADN-ului și (b) sinteza continuă și discontinuă a ADN-ului .
15. Enumerați proteinele care desfac ADN-ul în timpul sintezei ADN-ului *in vivo.* Cum funcționează acestea?
16. Definiți și precizați importanța (a) fragmentelor Okazaki , (b) ligazei ADN și (c) primerului ARN în timpul replicării ADN-ului .
17. Rezumați modelul actual de sinteză a ADN- ului .
18. De ce se așteaptă ca sinteza ADN-ului să fie mai complexă la eucariote decât la bacterii? În ce fel este similară sinteza ADN-ului la aceste două tipuri de organisme?
19. Să presupunem că *E. coli* sintetizează ADN cu o rată de 100.000 de nucleotide pe minut și are nevoie de 40 de minute pentru a- și replica cromozomul. (a) Câte perechi de baze există în cromozomul complet al *E. coli?* (b) Care este lungimea fizică a cromozomului în configurația sa elicoidală, adică care este circumferința cromozomului dacă este deschis pentru a forma un cerc?
20. Mai multe tulpini mutante de E. *coli* sensibile la căldură prezintă următoarele caracteristici. Preziceți ce enzimă sau funcție este afectată de fiecare mutație.
    (a) ADN-ul nou sintetizat conține multe perechi de baze nepotrivite .
    (b) Fragmentele de Okazaki se acumulează, iar sinteza ADN-ului nu este niciodată completă.
    (c) Inițierea nu are loc.
    (d) Sinteza este foarte lentă.
    (e) Lanțurile superînrăsucite rămân după replicare, care nu este niciodată completă .
21. Deși multe antibiotice utilizate în mod obișnuit interferează cu sinteza proteinelor sau cu formarea peretelui celular , dorobiocina, unul dintre numeroasele antibiotice aparținând clasei aminocumarinelor , inhibă activitatea ADN-girazei bacteriene . Alte medicamente similare au fost testate ca tratamente pentru cancer la om. Cum ar putea fi aceste medicamente eficiente atât împotriva bacteriilor , cât și a cancerului ?
22. Definiți conversia genică și descrieți relația acestui fenomen cu recombinarea genetică .
23. Mulți dintre produșii genetici implicați în sinteza ADN-ului au fost inițial caracterizați prin investigarea tulpinilor mutante de *E. coli* care nu puteau sintetiza ADN.
    (a) Gena *dnaE* codifică subunitatea *α* a ADN polimerazei III . Ce efect este așteptat dacă există o mutație în această genă? Cum poate fi menținută tulpina mutantă?
    (b) Gena *dnaQ* codifică subunitatea *e* a ADN polimerazei. Ce efect este așteptat dacă există o mutație în această genă?
24. În 1994, activitatea telomerazei a fost descoperită în liniile celulare canceroase umane . Deși telomeraza nu este activă în țesuturile somatice umane, această descoperire a indicat faptul că oamenii posedă genele atât pentru proteina telomerază, cât și pentru ARN . Având în vedere că activarea necorespunzătoare a telomerazei poate duce la cancer, de ce credeți că genele care codifică această enzimă s-au menținut în genomul uman de-a lungul evoluției? Există tipuri de celule în corpul uman în care activarea telomerazei ar fi avantajoasă sau chiar necesară? Explicați.

Problemas extrapicantes

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

25. lui D. *melanogaster* are o lungime de aproximativ $1,7 \times 10^{-12}$ perechi de baze. Sinteza ADN-ului are loc cu o rată de 30 de baze pe secundă. În stadiul incipient al embrionului, întregul genom este replicat în cinci minute. Câte origini de sinteză bidirecțională sunt necesare pentru a realiza această performanță?
26. Luați în considerare un organism ipotetic în care replicarea ADN-ului este conservativă. Proiectați un experiment similar cu cel al lui Taylor, Woods și Hughes care ar demonstra fără echivoc acest lucru . Folosind formatul din Figura 11.5 , desenați cromatidele surori și schițați rezultatele așteptate care confirmă acest model de replicare.

ADN polimerazele din toate organismele adaugă doar nucleotide 5' la capătul 3' al catenei de ADN în creștere , niciodată la capătul 5'. Un posibil motiv este că majoritatea polimerazelor au o funcție de corectură, ceea ce nu ar fi posibil *din punct de vedere energetic* dacă sinteza ADN-ului ar avea loc în direcția 3'-5'.

(a) Desenați reacția pe care ADN polimeraza ar trebui să o catalizați dacă sinteza ADN-ului ar avea loc în direcția 3'-5'.

(b) Având în vedere informațiile din schema dvs., speculați de ce corectarea erorilor ar fi problematică.

28. Imaginează- ți că investighezi un organism extraterestru care prezintă „problema telomerilor " în timpul sintezei ADN-ului , dar numai la un capăt al fiecărui cromozom. Creează un model ADN care să fie în concordanță cu această observație. Este acest organism procariot sau eucariot?

29. Să presupunem că secvența de baze prezentată mai jos este prezentă într -o catenă de nucleotide a unui duplex de ADN și că catena este deschisă la o furcă de replicare . Un primer ARN este sintetizat pe această matriță, începând de la baza subliniată .

(a) Dacă primerul ARN este alcătuit din opt nucleotide, care este secvența sa de baze ?

(b) În primerul ARN intact, care nucleotidă are un capăt 3'-OH liber?

3' .....GGCTACCIGGATTCA .....5'

30. Luați în considerare următoarea diagramă. Să presupunem că cromozomul din fază G1 din stânga trece printr -un ciclu de replicare în prezența 3H-timidinei și că cromozomul din metafază din dreapta are ambele catene marcate . Ce model de replicare (conservativ, dispersiv, semiconservativ) ar putea fi exclus de această observație?

Cromozom în cromozomul Gl în metafază

Leyenda
Cromátida marcada
Cromátida no marcada

31. 1968, Reiji și Tuneko Okazaki au efectuat un experiment, considerat acum un clasic, în care au descoperit o populație de fragmente scurte sintetizate în timpul replicării ADN-ului . Au introdus o cantitate mică de 5H - timidină într- o cultură de E. coli și *au extras* ADN din celule la diferite intervale. Analizând ADN-ul după centrifugare în gradienți denaturați, au observat că, pe măsură ce intervalul dintre introducerea 5H-timidinei și centrifugare creștea , proporția de fragmente scurte scădea și se găsea mai mult ADN marcat în catenele mai lungi . Ce explică această observație?

32. Următorul tabel (date adaptate după Khodursky și colab ., 2000) prezintă procentul de sinteză a ADN-ului după 15 minute de la inițiere pentru patru tulpini de *Escherichia coli* cultivate la temperaturi permisive (30°C) și restrictive (42°C) și cu diferite concentrații de novobiocină, inhibitor de girază . Tulpinile au următoarele caracteristici și genotipuri: tip sălbatic, mutație a girazei sensibilă la temperatură (*gyr* ^{u}), rezistentă la novobiocină (gyr ^{r}) și dublu mutantă (x)' ^{r} ' '). Pe baza datelor din tabel , atribuiți genotipurile corespunzătoare tulpinilor etichetate A , B, C și D.

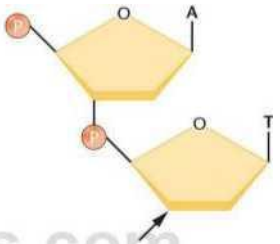
Temperatura "C	30			42		
Novobiocină (g/ml)	0	5	40	0	5	40
Cepa bacteriana						
O	100	56	9	40	26	1
B.	100	100	100	41	43	40
C.	100	58	4	100	56	3
D.	100	100	100	100	100	100

33 Luați în considerare următorul desen al unei dinucleotide.

(a) Este ADN sau ARN?

(b) Săgeata este mai aproape de capătul 5' sau de capătul 3' ?

(c) Să presupunem că molecula a fost scindată de enzima diesterază a splinei , care rupe legătura covalentă care leagă fosfatul de C-5'. După scindare, de care nucleozidă va fi atașat acum fosfatul (A sau T)?

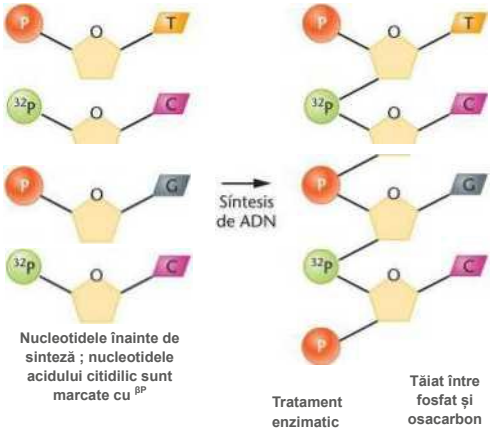


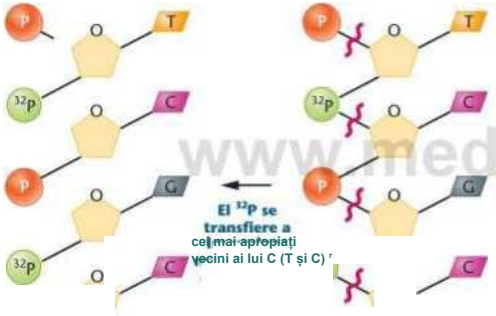
www.m ibros.com

34. Pentru a testa fidelitatea sintezei ADN-ului , Arthur Kornberg și colaboratorii săi au dezvoltat testul frecvenței celui mai apropiat vecin, care determină cât de frecvent apar două baze adiacente una față de cealaltă de-a lungul lanțului polinucleotidic (*J. Biol. Chem.* 236:864-875). Acest test sc se bazează pe enzima fosfodiesterază a splinei *(vezi* problema anterioară). După cum am văzut în Figura 11.8, ADN-ul este sintetizat prin polimerizarea nucleotidelor 5'; adică , fiecare nucleotid este adăugat cu fosfat la C-5' al dezoxiribozei . Cu toate acestea, așa cum se arată în figura următoare, enzima fosfodiesterază scindează ADN-ul între fosfat și atomul C-5', producând astfel nucleotide 3'. În acest test, fosfații doar ai uneia dintre cele patru nucleotide precursoare ale ADN-ului (de exemplu, cea a acidului citidilic) sunt făcuți radioactivi cu r, după care se sintetizează ADN-ul . ADN-ul este apoi supus scindării enzimatice , în timpul căreia fosfatul radioactiv este transferat la baza care este „cel mai apropiat vecin" pe partea 5' a tuturor nucleotidelor acidului citidilic .

După patru experimente separate, în fiecare dintre care unul dintre cele patru tipuri de nucleotide este radioactiv, se pot calcula frecvențele celor 16 posibili vecini apropiați . Când Kornberg a aplicat testul de frecvență al celui mai apropiat vecin la șablonul de ADN și produsul său rezultat în diverse experimente, el a găsit o concordanță generală între frecvențele celui mai apropiat vecin ale ambelor. Analiza datelor celui mai apropiat vecin l-a condus pe Kornberg la concluzia că cele două catene ale dublei helixuri au polaritate opusă. Demonstrați acest fapt determinând rezultatul acestei analize dacă catenele de ADN

prezentate mai jos sunt (a) antiparalele sau (b) paralele:


Síntesis de ADN
Nucleotidele înainte de sinteză ; nucleotidele acidului citidilic sunt marcate cu 8P
Tratament enzimatic
Tăiat între fosfat și osacarbon



(a)

1,5 m » 0,9 m

Lily - CpCpApTpTpCpT - p 3' ----------5*

față de *

(b)

1,5 m » 0,9 m

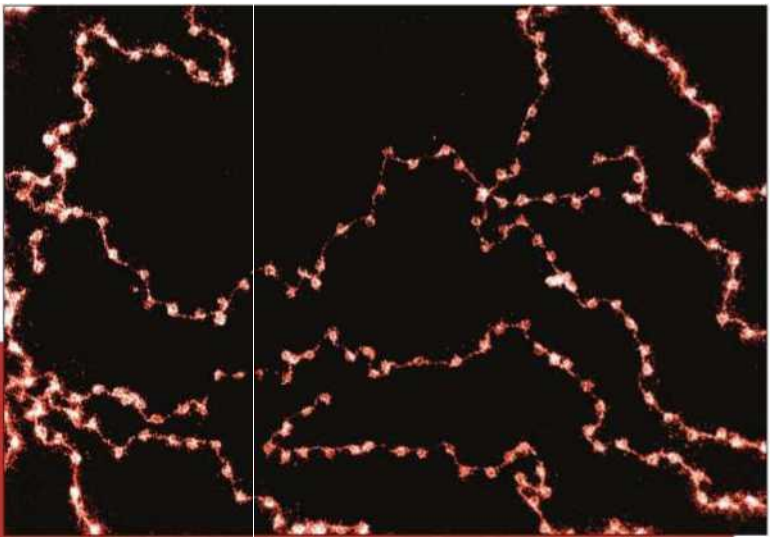
pCpCpTpTpApCpA

|| ||

pCpGpApApTpGpT

5′ » y

Fibras de cromatina saliendo de un eritrocito de gallina, vistas utilizando un microscopio electrónico.



12

Organizarea ADN-ului

CONCEPTE CAPITOL

Informația genetică din virusuri, bacterii, mitocondrii și cloroplaste este conținută, cu unele excepții , într- o moleculă de ADN scurtă, circulară, relativ lipsită de proteine asociate.

►> Celulele eucariote , spre deosebire de virusuri și bacterii, conțin cantități mari de ADN care, în cea mai mare parte a ciclului celular, este organizat în nucleozomi și se prezintă sub formă de fibre de cromatină neînfășurate sau cu structuri mai condensate.

în cromozomi

Las fibras de cromatina desenrolladas características de la interfase, se enrollan y condensan en cromosomas durante las etapas de la división celular eucariótica. Mientras que los genomas procarióticos están compuestos fundamentalmente por secuencias de ADN distintas que codifican proteínas, los genomas eucarióticos contienen una mezcla de secuencias de ADN tanto únicas como repetitivas.

►> Los genomas eucarióticos constan principalmente de secuencias de ADN no codificante.

Odată ce geneticienii au înțeles că ADN-ul este purtător de informații genetice, și-au îndreptat eforturile către descoperirea modului în care ADN-ul este organizat în gene și cum sunt aranjate aceste unități de bază ale funcției genetice. Acestea sunt organizate în cromozomi. Pe scurt, principalele întrebări la care au căutat să răspundă în continuare au fost legate de modul în care este organizat materialul genetic în cadrul genomului. Aceste întrebări sunt importante pentru înțelegerea multor domenii ale geneticii. De exemplu, modurile în care variază organizarea genomică au o influență majoră asupra reglării expresiei genelor.

În acest capitol, ne vom concentra asupra diferitelor moduri în care ADN-ul se organizează în cromatină, care, la rândul ei, se organizează în cromozomi. Aceste structuri au fost studiate folosind numeroase metode, inclusiv analize biochimice, precum și vizualizare prin microscopie optică și electronică. În prima parte a capitolului, după ce vom trece în revistă ceea ce știm despre cromozomii la virusuri și bacterii, vom examina două structuri eucariote specializate numite cromozomi politenici și cromozomi perie. În a doua jumătate a capitolului, vom discuta câteva dintre aspectele de bază ale organizării genomice la eucariote. Apoi, vom vedea cum sunt organizați cromozomii eucarioți la nivel molecular - de exemplu, cum se leagă ADN-ul de proteine pentru a forma cromatina și cum se condensează fibrele de cromatină caracteristice interfazei în structurile cromozomiale vizibile în timpul mitozei și meiozei . Vom încheia capitolul examinând câteva aspecte ale organizării secvenței de ADN în genomurile eucariote.

12.1

Cromozomii virali și bacterieni sunt molecule de ADN relativ simple

Comparativ cu cromozomii eucarioți, cromozomii virusurilor și bacteriilor sunt mult mai puțin complecși. Aceștia constau de obicei dintr-o singură moleculă de acid nucleic, spre deosebire de cromozomii multipli care alcătuiesc genomul organismelor superioare. Cromozomii procarioți sunt în general lipsiți de proteine asociate și conțin, relativ vorbind, mai puțină informație genetică. Aceste caracteristici au simplificat foarte mult analiza genetică la organismele procariote și avem acum o idee destul de clară despre structura cromozomilor lor.

Cromozomii virali sunt compuși dintr-o moleculă de acid nucleic - ADN sau ARN - care poate fi monocatenară sau bicatenară. Aceștia pot fi structuri circulare (bucle închise covalent) sau molecule liniare. ADN-ul monocatenar al bacteriofagului OX174 și ADN-ul bicatenar al poliomavirusului sunt molecule circulare închise adăpostite în învelișul proteic al virusurilor mature. În schimb , bacteriofagul lambda (Z) posedă, înainte de infecție , o moleculă de ADN liniară bicatenară, care se închide într-un cerc după infectarea celulei gazdă. Alte virusuri, cum ar fi bacteriofagii T-par, au cromozomi ADN liniari bicatenari care nu formează cercuri în bacteria gazdă. Prin urmare, circularitatea nu este o cerință esențială pentru replicarea virală .

de acid nucleic ale virusurilor au fost vizualizate cu microscopul electronic. Figura 12.1 prezintă un bacteriofag lambda matur cu molecula sa de ADN bicatenar într-o configurație circulară. O caracteristică constantă comună virusurilor, bacteriilor și celulelor eucariote este capacitatea de a împacheta o moleculă de ADN extrem de lungă într- un volum relativ mic . În fagul Z, ADN-ul are 17 µm lungime și trebuie să se potrivească în capul fagului, ale cărui laturi sunt mai mici de 0,1 µm. Tabelul 12.1 compară lungimile cromozomilor mai multor virusuri cu dimensiunea structurii capului lor. În toate cazurile, trebuie realizată aceeași performanță de împachetare. Comparați dimensiunile date pentru fagul T2 cu micrografia atât a ADN-ului, cât și a particulei virale prezentate în Figura 12.2. Spațiul disponibil în capul viral este rareori mai mare decât dublul volumului cromozomului . În multe cazuri , aproape tot spațiul este umplut , indicând faptul că împachetarea este aproape perfectă. Odată ambalat în interiorul capului, materialul genetic al virusului este inert funcțional până când este eliberat într-o celulă gazdă.

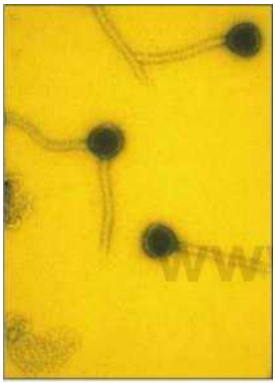
Cromozomii bacterieni au, de asemenea, o formă relativ simplă. Aceștia sunt întotdeauna alcătuiți dintr -o moleculă de ADN bicatenară, compactată într-o structură numită uneori nucleoid. *Escherichia coli,* bacteria cea mai studiată, are un - cromozom circular mare, care măsoară aproximativ 1.200 µm (1,2 mm) lungime. Când celula este lizată ușor și cromozomul este eliberat, acesta poate fi vizualizat cu un microscop electronic (Figura 12.3).

ADN-ul cromozomilor bacterieni este asociat cu mai multe tipuri de proteine care leagă ADN-ul. Două dintre aceste proteine, numite HU și H1, se caracterizează prin faptul că sunt mici, dar abundente în celulă și prin faptul că conțin un procent ridicat de aminoacizi încărcați pozitiv, care se pot lega ionic de sarcinile negative ale grupărilor fosfat ale ADN-ului. Deși aceste proteine sunt similare din punct de vedere structural cu moleculele numite *histeroizi ,* care sunt asociate cu ADN-ul eucariot (cum ar fi

TABELUL 12.1 Materialul genetic al unor virusuri și bacterii reprezentative.

Origine		Acid nucleic			
		Tip	CS sau DC*	Lungime (km)	Dimensiunea totală a capului viral sau bacterian (/im)
Virus	</>X174	ADN-ul	CS	2.0	0,025 X 0,025
	Virusul mozaicului tutunului	ARN	CS	3.3	0,30 × 0,02
	Fagul Lambda	ADN-ul	DC	17.0	0,07 × 0,07
	Fagul T2	ADN-ul	DC	52,0	0,07 × 0,10
Bacterii	*Haemophilus influenzae*	ADN-ul	DC	832,0	1,00 X 0,30
	Escherichia coli	ADN-ul	DC	1.200,0	2,00 X 0,50

•CS - lanț simplu; DC - lanț dublu



(a)

(b)

FIGURA 12.1 Micrografii electronice (a) ale fagului și (b) ale ADN-ului său izolat. Cromozomul măsoară 17 μm în lungime. Fagii au fost măriți de cinci ori mai mult decât ADN-ul.

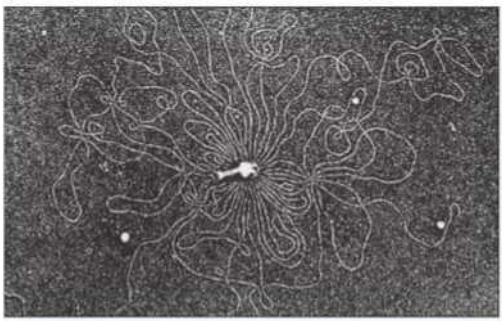


FIGURA 12.2 Micrografie electronică a bacteriofagului T2, cu ADN-ul său eliberat prin șoc osmotic. Cromozomul are o lungime de 52 µm.
FIGURA 12.3 Micrografie electronică a bacteriei *Escherichia coli,* cu ADN-ul său eliberat prin șoc osmotic. Cromozomul măsoară 1.200 m (

descris în Secțiunea 12.4), iar structurile sale nu sunt implicate în compactarea ADN-ului, spre deosebire de cele implicate în compactarea ADN-ului. Spre deosebire de cromozomul viral compactat din capul viral, cromozomul bacterian *nu este inert* funcțional și poate fi ușor replicat și transcris.

ACUM REZOLVĂ ASTA

12.1 La bacteriofagi *și* bacterii, ADN-ul este aproape întotdeauna organizat în cromozomi circulari (bucle închise). Fagul □ este o excepție, deoarece își menține ADN-ul într-un cromozom liniar în interiorul particulei virale. Cu toate acestea, imediat ce acest ADN este injectat într-o celulă gazdă, acesta se circularizează înainte de a începe replicarea. Ce avantaj există în replicarea moleculelor de ADN circulare în comparație cu moleculele liniare caracteristice cromozomilor eucarioți?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea replicării ADN-ului eucariot, așa cum este explicat în Capitolul 11. Cheia rezolvării ei constă în a analiza motivul pentru care enzima telomerază este esențială în replicarea ADN-ului eucariot și de ce cromozomii bacterieni și virali se pot replica fără a întâmpina problema „telomerilor”.*

12.2

Superînrăsucirea facilitează compactarea ADN-ului în cromozomii virali și bacterieni ■ '

ADN-ul este organizat și ambalat în cromozomii virali și bacterieni provine din descoperirea ADN-ului superînrăsucit, o caracteristică a moleculelor circulare închise. ADN-ul superînrăsucit a fost propus pentru prima dată ca urmare a unui studiu al moleculelor de ADN dublu catenar derivate din poliomavirus, care provoacă tumori la șoareci . În 1963, s-a observat că, atunci când ADN-ul poliomavirusului a fost centrifugat la viteză mare, acesta s-a separat în trei componente distincte, fiecare cu o densitate și un grad de compactare diferite. Componenta cea mai puțin compactă și, prin urmare , cea mai puțin densă, a prezentat o rată de sedimentare redusă; celelalte două fracțiuni au prezentat rate mai mari datorită compactării și densității lor mai mari. Greutatea moleculară a tuturor trei a fost identică.

În 1965, Jerome Vinograd a propus o explicație pentru observațiile anterioare. El a postulat că cele două fracțiuni cu cele mai mari rate de sedimentare erau molecule circulare de ADN, în timp ce fracțiunea cu cea mai mică rată de sedimentare conținea molecule de ADN liniare. Moleculele circulare închise sunt mai compacte și sedimentează mai rapid decât aceleași molecule în formă liniară.

Vinograd a mai propus că fracțiunea mai densă a celor două molecule circulare era compusă din spirale de ADN închise covalent, care sunt puțin mai puțin *înfășurate* în comparație cu moleculele circulare mai puțin dense . Forțele energetice care stabilizează dubla spirală rezistă acestei înfășurări reduse, determinând molecula în ansamblu să se superînfășoare - adică să se răsucească într-o formă specifică - pentru a menține împerecherea normală a bazelor. Vinograd a propus că această formă superînfășurată are ca rezultat o împachetare mai compactă și, prin urmare, crește rata de sedimentare .

Tranzițiile pe care tocmai le-am descris sunt prezentate în Figura 12.4. Să luăm în considerare o moleculă liniară cu lanț dublu având forma normală de helix dextro-girat Watson-Crick [Figura 12.4(a)]. Această helix conține 20 de spire complete, ceea ce înseamnă că numărul de legături (I) al acestei molecule este egal cu 20, adică $L = 20$. Să presupunem că

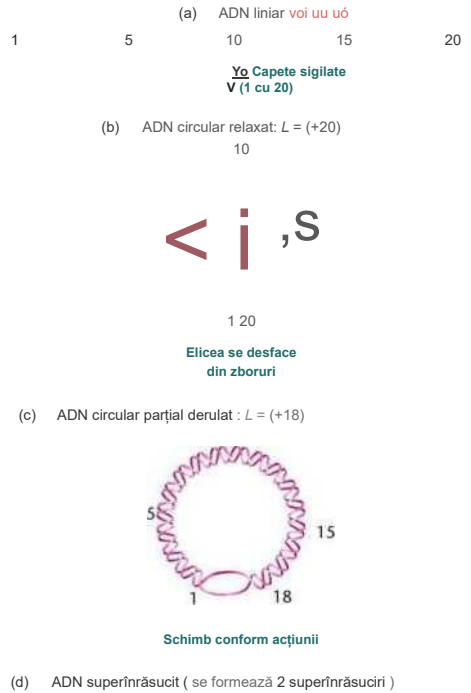


FIGURA 12.4 Schema transformărilor care duc la superînrăsucirea ADN-ului circular. *L* este numărul de legături.

Am dori să transformăm această moleculă liniară într-un cerc închis prin aducerea capetelor opuse împreună și unirea lor [Figura 12.4(b)]. Dacă cercul închis are încă un număr de legături de 20 (dacă nu am introdus și nici nu am eliminat nicio spirală la unirea capetelor), spunem că molecula este *relaxată energetic* . Acum, să presupunem că cercul este tăiat, două spire complete sunt desfășurate și apoi este resigilat [Figura 12.4(c)]. Această structură, în care *L* s-ar fi schimbat la 18, va fi *tensionată energetic* și, în consecință, își va schimba forma pentru a reduce tensiunea.

Pentru a presupune o conformație mai favorabilă din punct de vedere energetic , o moleculă parțial derulată va forma superînfășurări în direcția opusă derulării parțiale. În exemplul nostru [Figura 12.4(d)], două superînfășurări negative sunt introduse spontan, restabilind numărul total de spire ale helixului original. Termenul *„negativ"* se referă la faptul că, prin definiție, superînfășurările sunt stângoghinare (în timp ce helixul este dreptoghinare). Rezultatul final este formarea unei structuri mai compacte, cu o stabilitate fizică mai mare.

În majoritatea moleculelor circulare de ADN ale bacteriilor și fagilor acestora , helixul ADN este ușor derulat [ca în Figura 12.4(c)]. De exemplu, virusul SV40 conține 5.200 de perechi de baze. Dacă ADN-ul este relaxat energetic, fiecare rotație completă a helixului este ocupată de 10,4 perechi de baze, iar numărul său de legături poate fi calculat ca

Totuși, analiza ADN-ului circular al SV40 arată că acesta este desfășurat pe 25 de spire, deci *L* Aceasta este egală cu 475. Așa cum s-a prezis, în moleculă se observă 25 de superînfășurări negative . În *E. coli,* se observă un număr și mai mare de superînfășurări , ceea ce facilitează foarte mult condensarea cromozomilor în regiunea nucleoidă.

Când două molecule identice au un număr diferit de legături, acestea se numesc topoizomeri. Dar cum poate o moleculă fără capete libere să treacă de la un topoizomer la altul, așa cum este cazul ADN-ului cu cerc închis? Biologic, acest lucru poate fi realizat de oricare dintre enzimele dintr-un grup care taie una sau ambele catene și fie înfășoară, fie desfășoară helixul înainte de a resigila capetele.

Aceste enzime sunt denumite în mod corespunzător topoizomeraze. Descoperite inițial de Martin Gellert și James Wang, aceste molecule catalitice pot fi de tip I sau de tip II, în funcție de faptul dacă taie una sau ambele catene ale helixului. În *E. coli,* topoizomeraza I servește la reducerea numărului de superînfășurări negative dintr-o moleculă de ADN circulară închisă . Topoizomeraza II introduce superînfășurări negative în ADN. Se crede că această ultimă enzimă se leagă de ADN, îl răsucește, taie cele două catene și apoi le trece prin bucla pe care a creat-o. Când legăturile fosfodiesterice sunt restabilite , numărul de legături a - scăzut, astfel încât se formează spontan una sau mai multe superînfășurări .

ADN-ul superînrăsucit și topoizomerazele se găsesc și la eucariote. Deși cromozomii acestor organisme nu sunt în general circulari, superînrăsucirile se pot forma atunci când regiunile ADN-ului sunt încorporate într-o rețea de proteine asociate cu fibrele de cromatină . Această asociere formează capete „ancorate", care asigură stabilitate pentru menținerea superînrăsucirilor odată ce acestea au fost introduse de topoizomeraze . Atât la procariote, cât și la eucariote , replicarea și transcripția ADN-ului generează superînrăsuciri în aval , pe măsură ce dubla spirală se desface pentru a deveni accesibilă enzimei corespunzătoare.

Topoizomerazele pot juca și alte roluri genetice care implică modificări conformaționale în ADN-ul eucariot. Interesant este că aceste enzime sunt implicate în separarea (desfacerea) ADN-ului cromatidelor surori după replicare.

12.3

Cromozomii specializați prezintă variații în organizarea ADN-ului

Vom analiza acum două cazuri de organizare genetică care constituie forme specializate pe care le pot adopta cromozomii eucarioți . Ambele tipuri — *cromozomi politeni* și *cromozomi perie (sau peni)* — Sunt atât de mari încât organizarea lor putea fi studiată folosind microscopia optică cu mult înainte de a înțelege cum se formează cromozomii mitotici din cromatina în interfază . Studiul acestor cromozomi a oferit multe dintre perspectivele inițiale asupra organizării și funcției informației genetice. Este important de știut că cromozomii politeni și perie sunt mai puțin comuni și nu se găsesc de obicei în majoritatea celulelor eucariote, dar studiul structurii lor a dezvăluit multe principii de bază comune organizării cromozomilor.

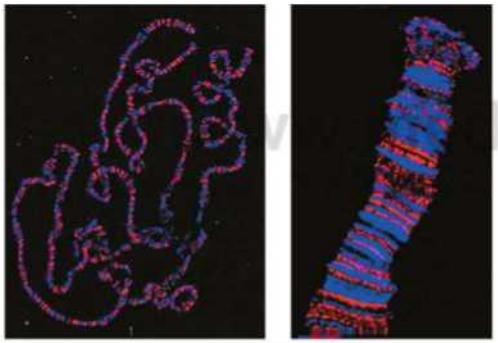
Cromozomi politeni

Cromozomii politenici gigantici pot fi găsiți în diverse țesuturi (glande salivare, tract digestiv, rect și tubuli excretori) la larvele unor muște ,

precum și la unele specii de protozoare și plante. Aceștia au fost - observați pentru prima dată de E.G. Balbiani în 1881. Bogăția de informații obținute din studiul acestor structuri genetice a oferit un sistem model pentru cercetările ulterioare asupra cromozomilor. Ceea ce este deosebit de interesant la cromozomii politenici este faptul că aceștia pot fi observați în nucleul celulelor în interfază.

Fiecare cromozom politen are o lungime cuprinsă între 200 și 600 pm și, privit la microscop optic, prezintă o serie liniară de benzi și interbenzi alternante (Figurile 12.5 și 12.6). Modelul de benzi este specific fiecărui cromozom din fiecare specie dată. Uneori, fiecare dintre benzi este numită cromomer, un termen general care descrie condensările laterale ale materialului de-a lungul axei unui cromozom.

Studii ample care au utilizat microscopia electronică și trasori radioactivi au condus la o explicație pentru aspectul neobișnuit al acestor cromozomi. În primul rând,



AGURA 12.5 Cromozomi politenici ai celulelor glandelor salivare ale *larvelor de Drosophila.*

Cromozomii politeni reprezintă omologi perechi . Acest lucru este foarte rar , deoarece se găsesc în celulele somatice , unde, în majoritatea organismelor , materialul cromozomial este de obicei dispersat sub formă de cromatină , iar omologii nu sunt perechi. În al doilea rând , dimensiunea lor mare și aspectul distinctiv se datorează faptului că sunt compuși din multe catene de ADN identice. ADN -ul acestor omologi perechi trece prin multe cicluri de replicare , *dar fără ca catenele să se separe și fără divizarea citoplasmei* . Pe măsură ce replicarea continuă, se formează cromozomi care au între 1.000 și 5.000 de catene de ADN paralele perfect aliniate . Se pare că aranjamentul paralel al atâtor catene de ADN este cel care dă naștere modelului distinctiv de benzi de-a lungul axei cromozomiale .

Prezența benzilor pe cromozomii polienici a fost inițial interpretată ca manifestarea vizibilă a genelor individuale. Această interpretare a fost consolidată atunci când s-a constatat că lanțurile prezente în benzi suferă o desfășurare localizată în timpul activității genelor . Fiecare dintre aceste evenimente de desfășurare are ca rezultat o umflătură numită puf, denumită astfel datorită aspectului său la microscop (Figura 12.6). Faptul că pufurile sunt manifestări vizibile ale unui nivel ridicat de activitate genică (ARN producător de transcripție) este demonstrat de rata lor mare de încorporare a precursorilor ARN marcați radioactiv, confirmată prin autoradiografie. Benzile care nu se umflă în pufuri încorporează mai puțini precursori radioactivi sau deloc.

Studiul benzilor în timpul dezvoltării insectelor precum *Drosophila* Țânțarul *Chironomus* prezintă o activitate genetică diferențială . Pe măsură ce dezvoltarea progresează , se observă un model caracteristic de benzi , legat de activarea genelor . În ciuda numeroaselor încercări de a clarifica această problemă, încă nu este

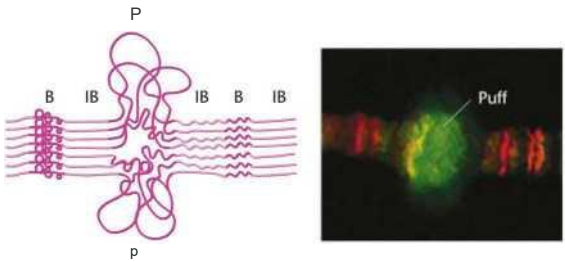


FIGURA 12.6 Fotografía de un puff dentro de un cromosoma politénico. El esquema muestra el desenrollamiento de las cadenas de una región de la banda (B) para producir un puff (P) en un cromosoma politénico. Cada banda (B) representa un cromómero. También se indican las regiones entre bandas (IB).

clar câte gene se află în fiecare bandă. Cu toate acestea , știm că la *Drosophila,* care are aproximativ 15.000 de gene, există aproximativ 5.000 de benzi. Se știe că o bandă conține până la 10 perechi de baze de ADN, ceea ce reprezintă suficient ADN pentru a codifica între 50 și 100 de gene de dimensiuni medii.

ACUM REZOLVĂ ASTA

12.2 După izolarea *și* cultivarea glandelor salivare de Drosophila în prezența acidului timidilic radioactiv , se efectuează autoradiografie , evidențiind cromozomii polienici. Prezicerea distribuției granulelor de-a lungul cromozomilor.

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea organizării ADN-ului în cromozomii polienici. Cheia rezolvării ei este conștientizarea faptului că n-timidina, ca trasor molecular, va fi încorporată în ADN doar în timpul replicării.*

Cromozomi asemănători periei sau pene

Un alt tip de cromozom special, care ne-a oferit informații despre structura cromozomilor, este cromozomul perie. A primit acest nume deoarece aspectul său este similar cu periile folosite pentru curățarea coșurilor de fum în secolul al XIX-lea. Walther Flemming a descoperit cromozomii perie în ovocitele de salamandră în 1892 , iar acești aceiași cromozomi au fost observați ulterior în ovocitele de rechin de către J. Rückert în 1892. Acum se știe că sunt caracteristici majorității ovocitelor de vertebrate , precum și spermatocitelor unor insecte. Prin urmare, sunt cromozomi meiotici. O mare parte din lucrările experimentale efectuate asupra lor au fost realizate folosind material extras din ovocitele de amfibieni.

Acești cromozomi speciali pot fi ușor izolați în ovocite în timpul subfazei de diplotenă a profaza I meiotică , când direcționează activitatea metabolică a celulelor în curs de dezvoltare . Cromozomii omologi apar ca perechi sinapsate unite prin chiasmate. Cu toate acestea, în loc să fie condensați, așa cum este cazul majorității cromozomilor meiotici , cromozomii perie au adesea lungimi între 500 și 800 pm. Mai târziu, în meioză, aceștia revin la lungimea lor normală de 15 până la 20 µm. Pe baza acestor observații, - cromozomii perie sunt interpretați ca versiuni extinse, neînfășurate, ale cromozomilor meiotici normali.

Cele două imagini ale cromozomilor perie din Figura 12.7 oferă informații importante despre morfologia lor. Partea (a) a figurii prezintă configurația meiotică la microscop optic. Axa liniară a fiecărei structuri orizontale vizibile în figură conține un număr mare de zone condensate care, la fel ca în cazul cromozomilor polienici, se numesc *cromomere.* Din fiecare cromomer iese o pereche de bucle laterale, care conferă cromozomului aspectul său distinctiv . În partea (b) a figurii, micrografia electronică cu scanare (SEM) prezintă în detaliu numeroase perechi de bucle adiacente de-a lungul uneia dintre axe . La fel ca în cazul benzilor cromozomilor politenici, fiecare buclă conține mult mai mult ADN decât este necesar pentru a codifica o singură genă. Această imagine SEM oferă o imagine clară a cromomerelor și a fibrelor cromozomiale care se ramifică din acestea . Se consideră că fiecare buclă cromozomială este formată dintr - o dublă helix de ADN , în timp ce axa centrală este formată din două helixuri de ADN. Această ipoteză este în concordanță cu convingerea că fiecare cromozom meiotic este format dintr -o pereche de cromatide surori. Studiile care utilizează precursori radioactivi de ARN arată că buclele sunt active în sinteza ARN-ului . Buclele acestor cromozomi, similare cu protuberanțele cromozomilor mai politenici , reprezintă ADN care s-a separat de axa cromomerică centrală în timpul transcripției.

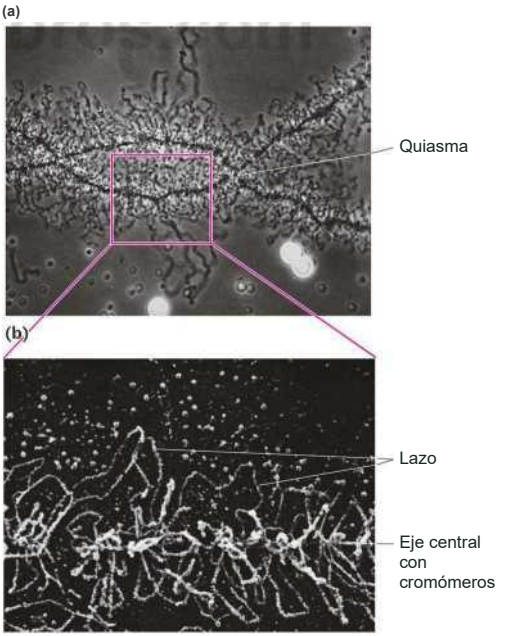


FIGURA 12.7 Cromosomas en escobilla de oocitos de anfibio, (a) Fotomicrografía, (b) Micrografía electrónica de rastreo.

12.4

ADN-ul este organizat în cromatină la eucariote

Ne vom concentra acum atenția asupra modului în care ADN-ul este organizat în cromozomi eucarioți, care sunt cel mai clar vizibili ca structuri foarte condensate în timpul mitozei. Cu toate acestea, după ce cromozomii se separă în timpul diviziunii celulare, celulele intră în stadiul de interfază al ciclului celular, moment în care componentele cromozomilor se desfac și se decondensează, luând o formă numită cromatină . În timpul interfazei , cromatina este dispersată în tot nucleul . Pe măsură ce ciclul celular progresează , celulele își pot replica ADN-ul și pot reintra în mitoză, moment în care cromatina se înfășoară și se condensează din nou în cromozomi vizibili. Această condensare reprezintă o contracție în lungime de aproximativ 10.000 de ori pentru fiecare fibră de cromatină.

Organizarea ADN-ului în timpul tranzițiilor tocmai descrise este mult mai complicată și complexă decât la virusuri sau bacterii , care nu prezintă niciodată un proces complex asemănător mitozei . Această complexitate se datorează cantității mai mari de ADN per cromozom la eucariote, precum și prezenței unui număr mare de proteine asociate cu ADN-ul eucariot. De exemplu, în timp ce ADN -ul dintr-un cromozom *E. coli* are o lungime de 1.200 pm, ADN-ul din fiecare cromozom uman variază în lungime de la 19.000 la 73.000 pm. Într-un singur nucleu uman, cei 46 de cromozomi conțin împreună suficient ADN pentru a ajunge la aproape 2 metri lungime. Acest material genetic, împreună cu proteinele sale asociate, este conținut într- un nucleu al cărui diametru măsoară de obicei între 5 și 10 pm.

Această complexitate este în paralel cu diversitatea structurală și biochimică a numeroaselor tipuri de celule prezente în organismele eucariote multicelulare. Diferite celule își asumă funcții specifice bazate pe activități biochimice extrem de specifice. Deși toate celulele conțin un arsenal genetic complet, diferite celule activează diferite grupuri de gene. Prin urmare, este evident că trebuie să existe un sistem de reglare ordonat care să guverneze utilizarea informațiilor genetice. Un astfel de sistem trebuie, într -un fel, să fie impus de sau legat de structura moleculară a materialului genetic.

Structura cromatinei și nucleozomi

După cum am văzut deja, materialul genetic al virusurilor și bacteriilor constă din catene de ADN sau ARN practic lipsite de proteine. În schimb, în cromatina eucariotă, există o cantitate substanțială de proteine asociate cu ADN-ul cromozomial în toate etapele ciclului celular. Proteinele asociate pot fi clasificate ca histone încărcate pozitiv sau ca *proteine non-histone* cu o sarcină pozitivă mai mică. Dintre aceste două grupuri, histonele joacă în mod clar rolul structural cel mai esențial. Histonele conțin cantități mari de aminoacizi încărcați pozitiv lizină și arginină, ceea ce le permite să se lege electrostatic de grupările fosfat încărcate negativ ale nucleotidelor. Reamintim că o interacțiune similară a fost propusă pentru mai multe proteine bacteriene. Cele cinci tipuri principale de histone sunt enumerate în Tabelul 12.2 .

TABELUL 12.1 Categorii și proprietăți ale proteinelor histonice.

Tipul de histonă	Conținut de lizină și arginină	Greutate moleculară (D.)
H1	Bogat în lizină	23.000
H2A	Ușor bogat în lizină	14.000
H2B	Ușor bogat în lizină	13.800
H3	Bogat în arginină	15.300
H4	Bogat în arginină	11.300

Modelul general al structurii cromatinei se bazează pe presupunerea că fibrele de cromatină , compuse din ADN și proteine, suferă procese extinse de înfășurare și pliere pe măsură ce se condensează în nucleul celular. Mai mult, studiile de difracție cu raze X confirmă faptul că histonele joacă un rol semnificativ în structura cromatinei . Cromatina produce inele de difracție distanțate regulat, sugerând prezența unor unități structurale repetitive de-a lungul axei cromatinei . Dacă moleculele de histone sunt îndepărtate chimic din cromatină , regularitatea acestui model de difracție este perturbată .

Modelul de bază al structurii cromatinei a fost dezvoltat la mijlocul anilor 1970. Următoarele observații au fost deosebit de relevante pentru dezvoltarea acestui model:

1. Digestia cromatinei de către anumite endonucleaze, cum ar fi nucleaza micrococică, produce fragmente de ADN de aproximativ 200 de perechi de baze sau multipli ai acestora . Această digestie enzimatică nu este aleatorie, deoarece, dacă ar fi, s-ar aștepta o gamă largă de dimensiuni ale fragmentelor . Prin urmare, cromatina este compusă dintr - un tip de unitate repetitivă, fiecare dintre acestea protejând ADN-ul de scindarea enzimatică, cu excepția locurilor în care două dintre aceste unități se unesc . În aceste locuri , dintre unități, enzima

taie .

2. Observațiile cromatinei prin microscopie electronică au relevat faptul că fibrele de cromatină sunt compuse din aranjamente liniare de particule sferice (Figura 12.8). Descoperite de Ada și Donald Olins, aceste particule sunt aranjate regulat de-a lungul axei unei catene de cromatină și seamănă cu niște mărgele pe un șir. Aceste particule, inițial numite *corpuri în V,* sunt acum cunoscute sub numele de nucleozomi. Aceste descoperiri sunt în perfectă concordanță cu observația anterioară, care sugerează existența unor unități repetitive.
3. Studiile privind asocierea chimică dintre moleculele de histone și ADN în nucleozomii cromatinei au arătat că histonele H2A, H2B, H3 și H4 produc două tipuri de tetrameri: $(H2A)_2$ • $(H2B)_2$ și $(H3)^1$ • (H4). Roger Kornberg a prezis că fiecare unitate nucleozomală repetitivă este formată dintr-un tetramer de fiecare tip (creând un octamer) în asociere cu aproximativ 200 de perechi de baze de ADN. O astfel de structură este în concordanță cu observațiile anterioare și oferă baza modelului care explică interacțiunea dintre histone și ADN în cromatină.

www.medi

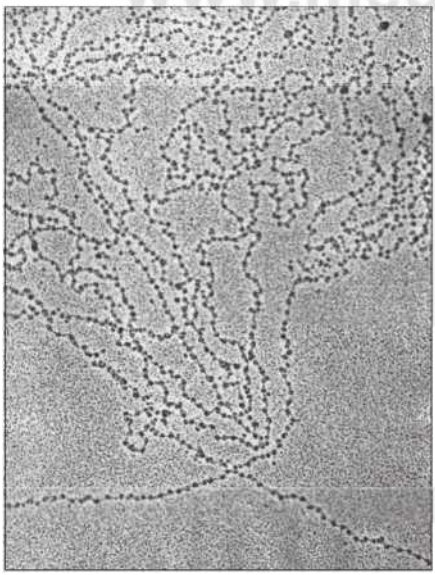


FIGURA 12.8 Micrografie electronică care prezintă nudeosomii ca „mărgele pe un colier" de-a lungul lanțurilor de cromatină derivate din *Drosophila melanogaster.*

4. Când timpul de digestie cu nuclează crește, o parte din cele 200 de perechi de baze ale ADN-ului sunt îndepărtate din nucleozom , creând ceea ce se numește particula centrală a nucleozomului, care constă din 147 de perechi de baze. ADN-ul pierdut în această digestie mai lungă este responsabil pentru legarea nucleozomilor între ei . Acest ADN de legătură este asociat cu a cincea histonă, H1 .

analizelor de împrăștiere cu raze X și neutroni ai particulelor nucleare cristalizate, efectuate de John T. Finch, Aaron Klug și alți oameni de știință, în 1984 a fost propus un model detaliat al nudeozomului, care a oferit baza pentru prezicerea structurii cromatinei și a condensării acesteia în cromozomi . În acest model , prezentat în Figura 12.9 , un fragment de 147 de perechi de baze din molecula de ADN, cu diametrul de 2 nm, este înfășurat în jurul unui octamer de histonă într -o superhelix stângaci care face 1,7 ture pe nudeozom. Fiecare nucleozom elipsoidal măsoară aproximativ 11 nm de-a lungul celei mai lungi axe a sale [Figura 12.9 (a)]. În mod semnificativ, formarea nucleozomului reprezintă primul nivel de împachetare , în care helixul ADN - ului este redus la aproximativ o treime din lungimea sa inițială prin înfășurarea în jurul histonei.

În nucleu, fibra de cromatină există rareori, dacă nu vreodată , în forma extinsă descrisă în paragraful anterior (adică, ca un lanț extins de nucleozomi) . În schimb, fibra de cromatină de 11 nm este în continuare compactată într- o structură mai groasă, cu diametrul de 30 nm , numită inițial solenoid *(* Figura 12.9(b)). Această structură mai groasă, dependentă de histone H1, este alcătuită din numeroși nucleozomi înfășurați și stivuiți unul peste altul , generând al doilea nivel de compactare. Aceasta asigură un grad de șase ori mai mare de compactare a ADN-ului. Această structură este caracteristică unei fibre de cromatină neînfășurate în timpul - interfazei ciclului celular. În tranziția către cromozomul mitotic , trebuie să aibă loc o compactare și mai mare . Structurile de 30 nm se pliază într-o serie de *domenii asemănătoare buclelor ,* condensând în continuare fibra de cromatină, care are acum 300 nm în diametru [Figura 12.9 (c)]. Aceste *fibre de cromatină spiralate sunt* apoi compactate în brațele cromozomilor , care constituie o cromatidă, una dintre subunitățile cromozomului metafazic [Figura 12.9 (d)]. Deși Figura 12.9 arată că brațele cromatidei măsoară 700 nm în diametru, această valoare variază , fără îndoială, între diferite organisme. Pentru o valoare de 700 nm, o pereche de cromatide surori care alcătuiesc un cromozom măsoară aproximativ 1.400 nm.

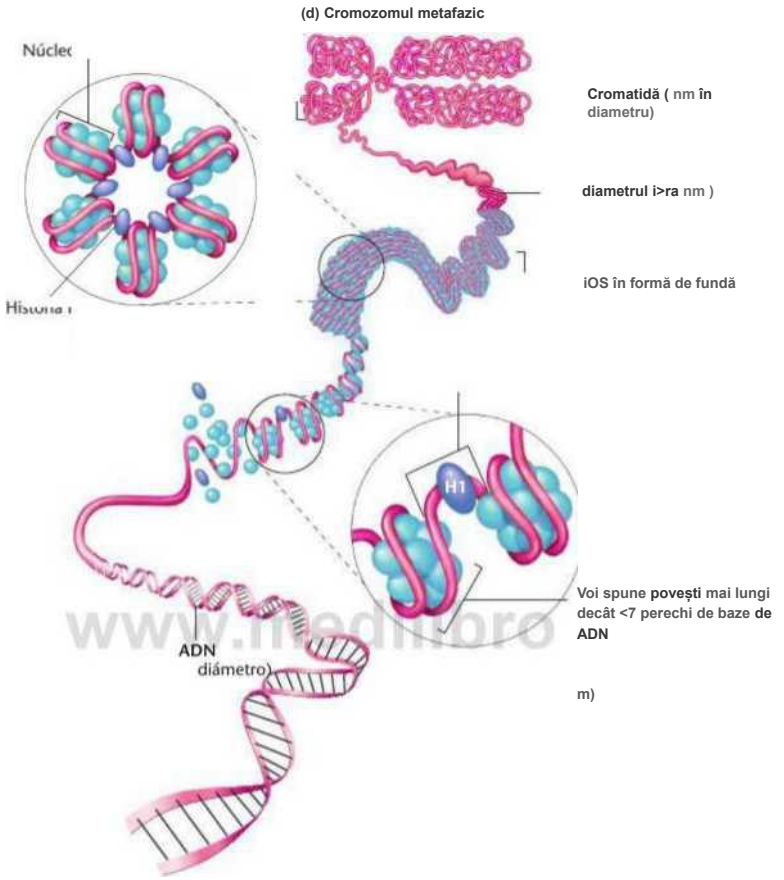


FIGURA 12.9 Model general de asociere dintre tristone şi ADN pentru a forma nucleozomi, ilustrând modul în care fiecare fibră de cromatină s-ar putea încolăci într-o structură mai condensată, producând în cele din urmă un cromozom în metafază.

Importanța organizării ADN -ului în cromatină și a cromatinei în cromozomi mitotici poate fi ilustrată considerând că o celulă umană își stochează materialul genetic într-un nucleu cu diametrul de aproximativ 5 până la 10 pm. Genomul haploid conține peste 3 miliarde de perechi de baze de ADN distribuite în 23 de cromozomi. Celula diploidă conține dublul acestei cantități. La 0,34 nm pe pereche de baze , aceasta reprezintă o lungime enormă de ADN (așa cum am menționat anterior, aproape 2 metri). Se estimează că ADN-ul prezent într-un nucleu uman tipic este organizat în aproximativ 25×10^{6} nucleozomi .

În tranziția generală de la o spirală de ADN complet extinsă la starea extrem de condensată a unui cromozom mitotic, trebuie atins un raport de împachetare (raportul dintre lungimea ADN-ului și lungimea structurii care îl conține) de aproximativ 500 la 1. De fapt, modelul nostru justifică un raport de împachetare de doar 50 la 1. Evident, fibra poate fi pliată, înfășurată și împachetată și mai mult pentru a obține o condensare mai mare în timpul formării unui cromozom mitotic.

ACUM REZOLVĂ ASTA

12.3 Dacă un nucleu uman are un diametru de 10 pm și trebuie să conțină până la 2 m de ADN, care formează nucleozomi cu un diametru de 11 nm atunci când este complet extins, ce procent din volumul nucleului este ocupat de material genetic?

- **SUGESTIE:** *Această problemă vă cere să efectuați niște calcule numerice - pentru a verifica cât de „plin" este nucleul eucariot cu cantitatea de ADN corespunzătoare unei celule diploide. Cheia rezolvării constă în utilizarea formulei V = (4/3)nt*, care calculează volumul unei sfere.*

Remodelarea cromatinei

Ca în cazul multor descoperiri importante din genetică, studiul nucleozomilor a răspuns la multe întrebări importante, dar , în același timp, a generat altele noi. De exemplu, în discuția anterioară, am stabilit că proteinele histonice joacă un rol structural important în împachetarea ADN-ului în nucleozomii care formează cromatina. Deși acestea ajută la rezolvarea problemei structurale a modului de organizare a unei cantități uriașe de ADN în nucleul eucariot, apare o nouă problemă: *în fibra de cromatină , care formează un complex cu histone pentru a crea nucleozomi și se poate plia în mai multe niveluri suplimentare de compactare, ADN -ul este inaccesibil interacțiunii cu proteine non-histonice importante.* De exemplu, diversele proteine care au funcții enzimatice și de reglare în timpul replicării și transcripției trebuie să interacționeze direct cu ADN-ul. Pentru a acomoda aceste interacțiuni proteină-ADN, trebuie induse modificări ale structurii cromatinei - un proces cunoscut acum sub numele de remodelare a cromatinei. În cazul replicării și expresiei genelor , cromatina trebuie să își relaxeze structura compactă și să expună regiuni ale ADN-ului la proteinele de reglare, dar trebuie să fie capabilă și să inverseze procesul în perioadele de inactivitate.

Primele idei despre cum ar putea fi obținute diferitele stări ale structurii cromatinei au început să fie testate în 1997, când Timothy Richmond și echipa sa de cercetare au reușit să îmbunătățească semnificativ rezoluția studiilor de difracție cu raze X ale cristalelor de nucleozomi , de la 7 Å în studiile din 1984 la 2,8 Å în studiile din 1997. Figura 12.10 prezintă un model bazat pe această lucrare. La această rezoluție, majoritatea atomilor sunt vizibili, dezvăluind răsucirile și întorsăturile subtile ale superhelixului ADN care înconjoară histonele. Reamintim că dubla helix reprezintă 147 de perechi de baze.

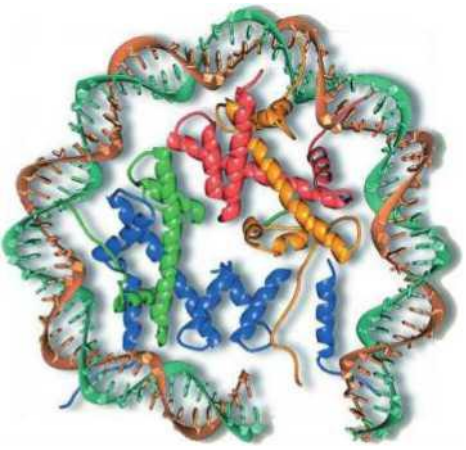


FIGURA 12.10 Ilustrația particulei nucleare de nucleozom, obținută prin analiza cristalografiei cu raze X cu o rezoluție de 2,8 Å. ADN -ul cu dublă spirală înconjoară patru perechi de histone.

baze ADN care înconjoară patru perechi de proteine histonice . Această configurație se repetă iar și iar de-a lungul fibrei de cromatină și este unitatea principală de împachetare a ADN-ului în nucleul eucariot.

În 2003, Richmond și colegii săi au obținut o rezoluție de 1,9 Å , dezvăluind locația precisă a fiecărei histone individuale în cadrul nucleozomului . De o relevanță deosebită pentru explicațiile remodelării cromatinei este observația că cozile de histone nestructurate nu sunt împachetate în domenii histone pliate în nucleozomi , ci mai degrabă proeminențează din acestea. De exemplu, cozile lipsite de orice structură secundară se extind din *histonele* H3 și H2B , proeminând prin canalele din șanțul minor al helixului ADN . Examinați cu atenție Figura 12.10 și veți găsi exemple de astfel de cozi. Se pare că alte cozi de histonă H4 stabilesc conexiuni cu mai mulți nucleozomi adiacenți. Importanța cozilor de histone constă în faptul că acestea oferă ținte potențiale de - a lungul fibrei de cromatină pentru diverse modificări chimice care ar putea fi legate de funcțiile genetice , inclusiv remodelarea cromatinei și posibila reglare a expresiei genelor .

Se știe acum că mai multe dintre aceste modificări chimice potențiale sunt importante pentru funcția genelor. Una dintre cele mai bine studiate modificări ale histonei implică acetilarea de către enzima

histon acetiltransferază (HAT). Adăugarea unei grupări acetil la gruparea amino încărcată pozitiv prezentă în lanțul lateral al aminoacidului lizină *modifică* efectiv sarcina netă a proteinei prin neutralizarea sarcinii pozitive. Histonele sunt abundente , iar geneticienii știu de mult timp că acetilarea este legată de activarea genelor. Se pare că nivelurile ridicate de acetilare deschid sau remodelează fibra cromatinei, efect care este crescut în regiunile cu gene active și redus în regiunile inactive. Un exemplu binecunoscut este inactivarea cromozomului X la mamifere , formând un corp Barr (Capitolul 7), în care histona H4 este foarte puțin acetilată.

Celelalte două modificări chimice importante sunt metilarea și fosforilarea aminoacizilor care alcătuiesc histonele . Aceste procese chimice rezultă din acțiunea enzimelor numite *metiltransferaze ,* respectiv *kinaze* . Grupările metil pot fi adăugate la reziduurile de arginină și lizină ale histonelor , iar această modificare a fost legată de activitatea genelor. Grupările fosfat pot fi adăugate la grupările hidroxil ale aminoacizilor serină și histidină, introducând o sarcină negativă în proteină. Se știe că fosforilarea, în special a histonei H3, crește în timpul ciclului celular în anumite momente caracteristice . Se crede că această modificare chimică este legată de ciclul de desfășurare și condensare a cromatinei care are loc în timpul și după replicările ADN-ului . Este important de menționat că toate aceste modificări chimice (acetilare , metilare și fosforilare) sunt reversibile sub conducerea unor enzime specifice.

Este interesant de observat că, în timp ce metilarea histonei *în* nucleozomi prezintă o corelație pozitivă cu activitatea genelor la eucariote, metilarea citozinei în *lanțurile polinucleotidice de ADN,* formând 5-metilcitozină, prezintă o corelație negativă cu activitatea genelor. Metilarea citozinei apare adesea atunci când acidul citidilic (nucleotidul) este adiacent acidului guanilic (nucleotidul), formând ceea ce se numește o insulă CpG. Prin urmare , trebuie să concluzionăm că metilarea poate avea fie un impact pozitiv, fie negativ asupra activității genelor.

Cercetarea descrisă ne extinde înțelegerea asupra organizării nucleozomilor și cromatinei și poate servi drept o introducere generală în conceptul de remodelare a cromatinei . Mai sunt multe de făcut pentru a elucida rolul specific al remodelării cromatinei în procesele genetice. În special, înțelegerea modului în care aceste modificări sunt influențate de moleculele reglatoare celulare va oferi perspective importante asupra expresiei genelor. Ceea ce este clar este că formele dinamice în care este prezentată cromatina sunt extrem de importante pentru modul în care se desfășoară toate procesele genetice în care ADN-ul este implicat direct . Vom discuta mai detaliat rolul remodelării cromatinei atunci când vom analiza reglarea expresiei genelor la eucariote în Capitolul 17. În plus , remodelarea cromatinei este un subiect important în epigenetică , studiul modificărilor expresiei genelor și genotipului unui organism care *nu sunt* atribuibile modificărilor secvenței de ADN care - alcătuiește o genă. Epigenetica este subiectul unuia dintre noile capitole *speciale din Genetica Modernă ,* inclus după Capitolul 19.

Heterocromatina

ADN-ul cromozomilor eucarioți este compus dintr-o fibră continuă cu dublă helix pe întreaga sa lungime, știm și că cromozomul nu este uniform din punct de vedere structural de la un capăt la altul. La începutul secolului al XX-lea , s-a observat că unele părți ale cromozomului rămân condensate și se colorează intens în timpul interfazei, în timp ce cea mai mare parte a acestuia este neînfășurată și nu se colorează. În 1928, termenii eucromatină și heterocromatină au fost inventați pentru a descrie părțile neînfășurate și respectiv condensate ale cromozomilor .

Cercetările ulterioare au relevat mai multe caracteristici ale heterocromatinei care o disting de eucromatină . Regiunile heterocromatice sunt inactive genetic, deoarece fie nu conțin gene , fie genele pe care le conțin sunt inactive. În plus, heterocromatina se replică mai târziu decât eucromatina în timpul fazei S a ciclului celular . Descoperirea heterocromatinei a oferit primele indicii că anumite părți ale cromozomilor eucarioți nu codifică întotdeauna proteine. De exemplu, se crede că o regiune heterocromatică specifică a cromozomului , telomerul , *este* ... Este implicată în menținerea integrității structurale a cromozomului, în timp ce o altă regiune, *centromerul,* este implicată în mișcarea cromozomilor în timpul diviziunii celulare.

Prezența heterocromatinei este caracteristică și distinctivă pentru materialul genetic al eucariotelor. În unele cazuri, cromozomi întregi sunt heterocromatici . Acesta este cazul cromozomului Y la mamifere, care este în mare parte inactiv genetic. Și, așa cum s-a discutat în Capitolul 7, cromozomul X inactivat al mamiferelor femele se condensează în heterocromatina inactivă a corpului Barr . La unele specii, cum ar fi viermii de făină , toți cromozomii dintr-unul dintre seturile haploide sunt heterocromatici.

Uneori, când anumite regiuni heterocromatice ale unui cromozom sunt translocate într-un nou situs pe același cromozom sau pe un cromozom neomolog, zonele care anterior erau active genetic devin inerte genetic dacă se află adiacente heterocromatinei translocate. După cum se vede în Capitolul 4, această influență asupra eucromatinei existente este un exemplu de ceea ce se numește în general efect de poziție. Adică, poziția unei gene sau a unui grup de gene în raport cu tot celălalt material genetic îi poate afecta expresia.

12,5

Bandarea cromozomială diferențiază regiunile de-a lungul cromozomului mitotic

Până în 1970, cromozomii mitotici vizualizați cu microscopul optic puteau fi distinși doar prin dimensiunile lor relative și poziția centromerilor lor. Din păcate, chiar și în organismele cu un număr mic de haploizi, există adesea doi sau mai mulți cromozomi care nu pot fi distinși. Cu toate acestea, noile proceduri citologice au făcut posibilă colorarea diferențială a cromozomilor mitotici de-a lungul axei lor. Aceste metode sunt numite acum tehnici de bandare a cromozomilor , deoarece modelele de colorare seamănă cu bandarea cromozomilor politeni.

Mary Lou Pardue și Joe Gall au conceput una dintre primele tehnici de bandare a cromozomilor. Acești oameni de știință au descoperit că, dacă preparatele de cromozomi de șoarece erau denaturate prin căldură și apoi tratate cu colorant Giemsa, apărea un model special de colorare: doar regiunile centromerice ale cromozomilor mitotici erau colorate. Prin urmare, acest model de colorare a fost numit bandare C. Este important pentru discuția care urmează să se ia în considerare faptul că această tehnică citologică identifică o zonă specifică a cromozomului compusă din heterocromatină. Figura 12.11 prezintă o micrografie a unui cariotip uman colorat în acest mod. Toți cromozomii de șoarece sunt telocentrici, astfel încât colorarea este localizată la capătul fiecărui cromozom.

Cam în aceeași perioadă, au fost dezvoltate și alte tehnici de bandare a cromozomilor . Cea mai utilă dintre aceste tehnici produce un model de colorare diferențială de-a lungul fiecărui cromozom . Această metodă, care produce benzi G (Figura 12.12), implică digestia cromozomilor mitotici cu enzima proteolitică tripsină, urmată de colorare cu Giemsa. Reacția de colorare diferențială reflectă heterogenitatea și complexitatea prezente de-a lungul cromozomului.

În 1971, a fost stabilită o nomenclatură uniformă pentru modelele de bandare a cromozomilor umani, bazată pe bandarea G. Figura 12.13 ilustrează aplicarea acestei nomenclaturi.

FIGURA 12.11 Prepararea unui cromozom mitotic uman procesat pentru vizualizarea benzilor C. Doar centromerii sunt colorați .

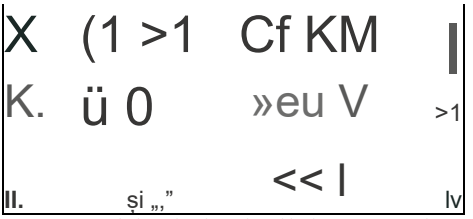


FIGURA 12.12 Cariotip cu bandă G al unui bărbat uman normal. Cromozomii provin din celule în metafază.

Nomenclatura cromozomului X. În stânga cromozomului sunt prezentate diferitele niveluri de organizare ale benzilor brațelor p și q care pot fi identificate, în timp ce nomenclatura din dreapta identifică regiunile specifice din cadrul fiecărei regiuni a cromozomului.

Deși mecanismele moleculare implicate în producerea diferitelor modele de bandare nu sunt pe deplin înțelese , importanța bandajului a fost enormă pentru analiza citogenetică , în special la om . Modelul de bandare al fiecărui cromozom este unic, permițând diferențierea chiar și între cromozomi cu dimensiuni și locații identice ale centromerului (de exemplu, cromozomii umani 4 și 5 și 21 și 22). Modelul de bandare al fiecărui cromozom este atât de precis încât permite distincția între omologi , iar atunci când un segment al unui cromozom s-a translocat în altul , originea sa poate fi determinată cu mare precizie.

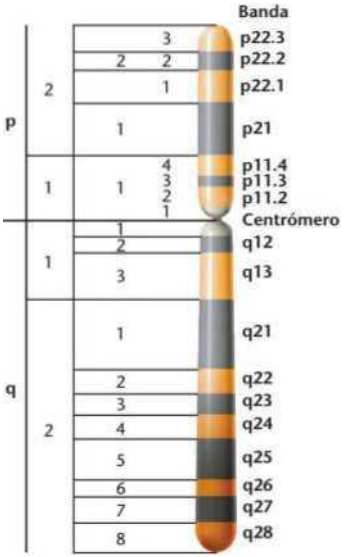


FIGURA 1 2.13 Regiuni ale cromozomului X uman diferențiate prin modelul lor de benzi. Etichetele din dreapta desemnează benzi specifice.

12.6

Genomurile eucariote prezintă o organizare complexă de secvențe caracterizate prin ADN repetitiv

Până acum, am examinat structura generală a cromozomilor la bacteriofagi, bacterii și eucariote. Acum vom examina ce știm despre organizarea secvențelor de ADN în cadrul cromozomilor care alcătuiesc genomul unui organism, cu un accent special pe eucariote. Odată ce am stabilit anumite aspecte generale ale acestei organizări, ne vom concentra asupra modului în care genele în sine sunt organizate în cadrul cromozomilor (*vezi* Capitolul 21).

În Capitolul 10 am presupus că, pe lângă secvențele unice de ADN care alcătuiesc genele, un număr mare de secvențe de ADN din cromozomii eucarioți sunt de natură repetitivă și că în genomul organismelor apar diverse niveluri de repetiție. Numeroase studii au furnizat informații despre ADN-ul repetitiv, demonstrând existența diferitelor clase ale acestor secvențe, precum și organizarea lor. Figura 12.14 rezumă aceste categorii . Unele gene sunt prezente în mai multe copii (și, prin urmare, sunt numite gene multicopie) și, prin urmare, sunt de natură repetitivă. Cu toate acestea, majoritatea secvențelor repetitive nu codifică proteine. Cu toate acestea , multe sunt transcrise, iar specia de ARN rezultată este implicată în remodelarea cromatinei. Vom analiza trei categorii principale: (1) heterocromatina asociată cu centromerii și cea care formează telomerii; (2) repetiții în tandem ale secvențelor de ADN scurte și lungi; și (3) secvențele transpozabile care sunt împrăștiate în tot genomul eucariotelor.

ADN satelit

Compoziția nucleotidelor (de exemplu, procentul de perechi G- C față de perechi A - T) a ADN-ului unei anumite specii se reflectă în densitatea ADN-ului său, care poate fi măsurată prin centrifugare la echilibru prin sedimentare (Capitolul 10). Când ADN-ul eucariot este analizat folosind această tehnică, graficul rezultat descrie compoziția sa ca un singur vârf principal , reprezentând o singură bandă principală cu o densitate destul de uniformă . Cu toate acestea , se observă și unul sau mai multe vârfuri care reprezintă ADN cu densități ușor diferite . Această componentă, numită ADN satelit, reprezintă o proporție variabilă din ADN-ul total, în funcție de specie. Figura 12.15 prezintă profilul ADN-ului cu banda principală și satelit la șoarece. În schimb , procariotele nu conțin ADN satelit .

Semnificația ADN- ului satelit a rămas un mister până la mijlocul anilor 1960 , când Roy Britten și David Kohne au dezvoltat o tehnică pentru măsurarea cineticii de reasociare a ADN-ului care fusese anterior disociat în catene simple (Capitolul 10). Acești cercetători au demonstrat că anumite porțiuni de ADN se reasociau mai rapid decât altele și au concluzionat că reasocierea rapidă era caracteristică fragmentelor multiple de ADN compuse din secvențe de nucleotide identice sau aproape identice , motiv pentru care se utilizează termenul descriptiv *ADN repetitiv* . Rețineți că, dimpotrivă , ADN-ul procariot este practic lipsit de orice secvență în afară de o singură copie.

Când ADN-ul satelit este supus analizei cinetice de reasociere (vezi *Capitolul* 10) , acesta se încadrează în categoria ADN -*ului extrem de repetitiv* . care este alcătuită din secvențe scurte repetate de un număr mare de ori. Noi dovezi au sugerat că aceste secvențe sunt prezente ca repetiții în tandem (adiacente) grupate în zone cromozomiale foarte specifice , cunoscute ca fiind heterocromatice, regiunile care flanchează centromerul . Acest lucru a fost descoperit în 1969 , când mai mulți cercetători, inclusiv Mary Lou Pardue și Joe

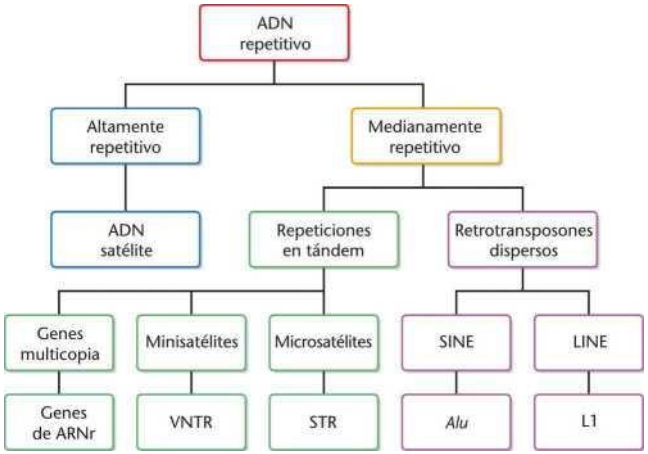
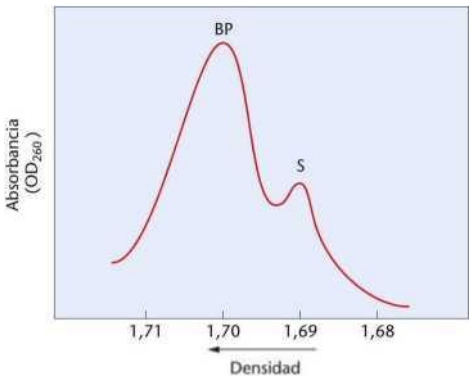


FIGURA 12.14 Schema generală a diferitelor categorii de ADN repetitiv .

tehnica hibridizării moleculare *in situ* pentru a studia ADN-ul satelit. Această tehnică implică hibridizarea moleculară între o fracțiune izolată de sonde de ADN sau ARN marcate radioactiv și ADN-ul conținut în cromozomii unui preparat citologic. Deși sondele - fluorescente sunt utilizate în mod obișnuit astăzi, Pardue și Gall au folosit sonde radioactive. După procesul de hibridizare, s-a efectuat autoradiografie pentru a localiza regiunile complementare ale fragmentului de ADN sau ARN pe cromozom.

Pardue și Gall au demonstrat că sondele moleculare radioactive obținute din ADN satelit de șoarece hibridizează cu ADN din regiunile centromerice ale cromozomilor mitotici de șoarece (Figura 12.16). Pe baza acestor rezultate, se pot trage mai multe concluzii: ADN-ul satelit diferă de ADN-ul din banda principală prin compoziția sa moleculară, așa cum a fost stabilit prin studiile densității de flotabilitate . Acesta este compus din secvențe scurte și



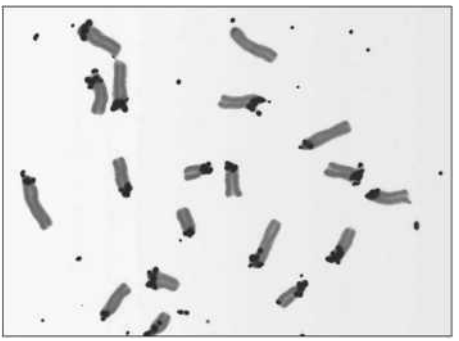


FIGURA 12.16 Hibridación *in situ entre* una sonda radioactiva que representa el ADN satélite de ratón *y* cromosomas mitóticos de ratón.

repetitive. În cele din urmă, ADN-ul satelit este localizat în regiunile centromerice heterocromatice ale cromozomilor .

Secvențe de ADN centromerice

Separarea cromozomilor omologi în timpul mitozei și meiozei depinde de centromeri, descriși ontologic la sfârșitul secolului al XIX-lea ca fiind *principalele constrângeri* de-a lungul cromozomilor eucarioți *(vezi* Capitolul 2). Secvența de ADN conținută în centromer este considerată acum critică pentru această funcție, iar o analiză atentă a confirmat această convingere. Regiunea minimă a centromerului care susține segregarea cromozomilor se numește regiunea CEN. În această regiune heterocromozomială a cromozomului, ADN-ul se leagă de o platformă proteică, care, în organismele multicelulare, include kinetocorul care se atașează de fibra fusului de diviziune în timpul diviziunii (vezi Figura 12.8).

Regiunile CEN ale drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* au fost primele studiate. Fiecare centromer îndeplinește o funcție identică, așa că nu este surprinzător faptul că CEN-urile diferiților cromozomi s-au dovedit a fi remarcabil de similare în organizarea lor. Regiunea CEN a cromozomilor de drojdie este compusă din aproximativ 120 de perechi de baze. Analiza mutațională sugerează că porțiunile din apropierea capătului 3' al acestei regiuni a ADN-ului sunt cele mai critice pentru funcția centromerului, deoarece mutațiile din aceste zone interferează cu funcția centromerului , în timp ce mutațiile mai apropiate de capătul 5' nu o fac . Prin urmare, ADN-ul din această regiune pare a fi esențial pentru atașarea fibrelor fusului de azot .

Secvențele centromerice ale organismelor eucariote multicelulare sunt mult mai lungi decât cele ale drojdiei și variază considerabil ca dimensiune. De exemplu, la *Drosophila* , regiunea CEN cuprinde 200 până la 600 kb de ADN, o mare parte din acesta fiind extrem de repetitiv (reamintim din explicațiile noastre anterioare că ADN-ul satelit extrem de repetitiv se află în regiunile centromerice ale șoarecilor). La oameni, una dintre cele mai cunoscute secvențe de ADN satelit este familia alfa -ide, care se găsește în principal în regiunile centromerice. Secvențele alfa-ide, fiecare cu 170 de perechi de baze , apar în structuri în tandem de până la 1 milion de perechi de baze. În prezent se crede că acest ADN repetitiv din organismele eucariote este transcris și că ARN-ul produs este implicat cumva în funcția kinetocorului.

Secvențe de ADN telomerice

Să revenim acum la un subiect pe care l-am introdus în Capitolul 11 , telomerul - structura care „acoperă" capetele cromozomilor eucarioți liniari. Explicațiile anterioare s-au concentrat pe replicarea ADN-ului telomeric, precum și pe modelul care descrie modul în care secvențele de ADN ale acestor structuri mențin stabilitatea cromozomilor. Structura heterocromatică a capacului face ca capetele cromozomilor să fie inerte la interacțiunea cu alte capete de cromozomi și cu enzimele care utilizează capetele ADN-ului dublu catenar ca substrat (cum ar fi enzimele de reparare). La fel ca în cazul centromerilor, analiza telomerilor a fost abordată pentru prima dată prin investigarea cromozomilor mai mici ai eucariotelor simple, cum ar fi protozoarele și drojdia. Astăzi, a fost confirmată ideea că toți telomerii de pe toți cromozomii organismelor înrudite ar putea avea o secvență nucleotidică comună.

Secvențele de ADN telomeric constau din repetiții scurte în tandem. Acest grup de secvențe repetitive contribuie la stabilitatea și integritatea cromozomilor. La ciliata *Tetrahymena,* există peste 50 de repetiții în tandem ale secvenței hexanucleotidice 5'-TTGGGG-3'. La toate vertebratele, inclusiv la oameni , secvența 5'-TTAGGGG-3' se repetă de mai multe ori. Numărul de copii care alcătuiesc un telomer variază între diferite organisme, iar la unele specii pot exista până la 1000 de repetiții.

O întrebare fundamentală se referă la rolul acestor secvențe repetitive de ADN în funcția telomerică. Descoperiri recente au stabilit că secvențele sunt transcrise și că produsul ARN, numit - TERRA (*telomere repeat-containing* ARN - ARN care conține repetiții telomerice), este o componentă integrantă a telomerului, contribuind la natura sa heterocromatică prin facilitarea metilării histonei H3K9. În plus, s-a demonstrat că aceste secvențe reglează telomeraza, enzima care conține ARN și care replică telomerul *(vezi* Capitolul 11). Acest lucru este posibil deoarece secvențele TERRA sunt complementare celor ale componentei ARN a telomerazei, care furnizează șablonul pentru sinteza ADN-ului telomeric. Acționând ca ligand pentru telomerază, TERRA funcționează ca un inhibitor al acestei enzime.

Cunoașterea modului în care se reglează telomeraza este de mare interes deoarece, în organismele multicelulare, inclusiv la oameni, telomeraza este activă în celulele germinale , dar nu și în celulele somatice . Iar în celulele canceroase umane care au devenit nemuritoare, tranziția către malignitate pare să necesite activarea telomerazei pentru a evita senescența normală asociată cu scurtarea cromozomilor.

Secvențe moderat repetitive: VNTR și STR

O scurtă menționare a altor categorii importante de ADN repetitiv ne lărgește înțelegerea organizării genomului eucariot. Pe lângă ADN-ul extrem de repetitiv, care constituie aproximativ 5% din genomul uman (și 10 % din genomul șoarecelui), există o a doua categorie, ADN-ul moderat (sau mediu) repetitiv, recunoscut prin C-analiză și destul de bine caracterizat. Întrucât știm acum atât de multe despre genomul uman, vom folosi propria noastră specie pentru a ilustra această categorie de ADN în organizarea genomului.

Deși ADN-ul moderat repetitiv include unele gene duplicate (cum ar fi cele care codifică ARN ribozomal) , cele mai importante secvențe din această categorie cuprind repetiții în tandem necodificatoare și secvențe dispersate necodificatoare. Nicio funcție nu a fost încă atribuită acestor componente ale genomului. Un exemplu este ADN-ul descris ca repetiții în tandem cu număr variabil (VNTR *).* Aceste secvențe repetitive de ADN pot varia de la 15 la 100 de perechi de baze în lungime și se găsesc între și în interiorul genelor. Multe dintre aceste grupuri sunt împrăștiate în tot genomul și sunt adesea denumite minisateliți .

Numărul de copii în tandem ale fiecărei secvențe specifice într-o anumită locație variază între indivizi, formând regiuni localizate cu o lungime de 1.000 până la 20.000 de perechi de baze (1 până la 20 kb). După cum vom vedea în Capitolul 21 , variația dimensiunii (lungimii) acestor regiuni între indivizii speciei umane a stat inițial la baza tehnicii criminalistice cunoscute sub numele de amprentare ADN .

Un alt grup de secvențe repetitive în tandem este format din di-, tri-, tetra- și pentanucleotide, numite și microsateliți sau repetiții scurte în tandem (STR *).* La fel ca VNTR-urile , acestea sunt împrăștiate în tot genomul și variază între indivizi în ceea ce privește numărul de repetiții prezente la un anumit situs . De exemplu, la oameni , cel mai comun microsatelit este dinucleotida (CA)*n*, unde *n* reprezintă numărul de repetiții. Cel mai frecvent, *n* este între 5 și 50. Aceste clustere au fost foarte utile ca markeri moleculari în analiza genomului.

Secvențe transpuse repetitive: SINE și UNE

Există încă o categorie de ADN repetitiv, constând din secvențe împrăștiate în tot genomul , în loc să fie repetate în tandem. Aceste secvențe pot fi scurte sau lungi, iar multe au distincția suplimentară de a fi secvențe transpozabile - secvențe mobile care se pot deplasa potențial în alte locații din cadrul genomului. O mare parte a genomului uman este compusă din aceste secvențe. Secvențele transpozabile sunt discutate în detaliu în Capitolul 15.

De exemplu, elementele *scurte intercalate* , numite SINE-uri , au o lungime mai mică de 500 de perechi de baze și pot număra până la 500.000 sau mai mult în genomul uman. Cel mai bine caracterizat SINE uman este un set de secvențe strâns înrudite numit familia *Alu* . (Numele derivă de la prezența secvențelor de ADN recunoscute de enzima de restricție pentru *nucleotidul endogen Alui.)* Membrii acestei familii de ADN , care se găsește și la alte mamifere, au o lungime cuprinsă între 200 și 300 de perechi de baze și sunt distribuiți destul de uniform în întregul genom , atât între gene, cât și în interiorul acestora. La oameni, această familie cuprinde mai mult de 5 % din întregul genom.

Secvențele *Alu* sunt deosebit de interesante deoarece unii membri ai familiei Alu *sunt transcriși în ARN, deși* funcția specifică a acestui ARN nu este pe deplin înțeleasă. Cu toate acestea , consecința secvențelor *Alu* este potențialul lor de transpoziție în cadrul genomului, care este legat de rearanjările cromozomiale din timpul evoluției. Se crede că secvențele *Alu* au provenit dintr-un element de ARN al cărui complement de ADN a fost dispersat în tot genomul ca urmare a activității transcriptazei inverse (o enzimă care sintetizează ADN-ul dintr -un șablon de ARN).

Grupul elementelor lungi dispersate (LINE) reprezintă o altă categorie de secvențe repetitive de ADN transpozabile. LINE-urile au de obicei o lungime de aproximativ 6 kb și apar de aproximativ 850.000 de ori în genomul uman. La om, cel mai important exemplu este familia Ll. Membrii acestei familii de secvențe au o lungime de aproximativ 6.400 de perechi de baze și se estimează că sunt prezenți de peste 500.000 de ori. Capătul lor 5' este foarte variabil, iar funcția acestor elemente în genom nu a fost încă definită .

Totuși, mecanismul general de transpoziție a elementelor Ll este deja clar. Secvența de ADN Ll este mai întâi transcrisă într- o moleculă de ARN . ARN -ul servește apoi ca șablon pentru sinteza ADN -ului complementar folosind enzima transcriptază inversă . Această enzimă este codificată într -o porțiune a secvenței Ll . Noua copie a Ll este integrată în ADN-ul cromozomului la un nou situs. Având în vedere similaritatea dintre acest mecanism de transpoziție și cel utilizat de retrovirusuri , se spune că LINE-urile sunt retrotranspozoni.

SINE-urile și LINE-urile reprezintă o porțiune semnificativă a ADN-ului uman. SINE-urile constituie aproximativ 13 % din genomul uman , în timp ce LINE-urile

reprezintă până la 21%. Ambele tipuri de elemente includ secvențe repetitive de ADN în combinație cu secvențe unice.

Gene multicopie moderat repetitive

În unele cazuri, ADN-ul moderat repetitiv include gene funcționale prezente în copii multiple repetate în tandem. De exemplu, există copii multiple ale genelor care codifică ARN-ul ribozomal. *Drosophila* are 120 de copii per genom haploid. Unitățile genetice singulare codifică o moleculă precursoare lungă care este procesată în ARNr 5.8S, 18S și 28S. La om, copii multiple ale acestei gene se găsesc grupate pe brațul p al cromozomilor acrocentrici 13, 14, 15, 21 și 22. Copii multiple ale genelor care codifică ARNr 5S sunt transcrise separat din grupuri multiple situate la capătul terminal al brațului p al cromozomului 1.

12.7

Marea majoritate a genomului eucariot nu codifică gene funcționale

Având în vedere informațiile de mai sus despre diferitele tipuri de ADN repetitiv din eucariote, este interesant să ne punem următoarea întrebare: *Ce procent din genomul eucariot codifică de fapt gene funcționale?*

Am văzut că, luate împreună, diferitele forme de ADN extrem de repetitiv și moderat repetitiv alcătuiesc o parte substanțială a genomului uman . Pe lângă ADN-ul repetitiv, o cantitate mare de ADN este compusă din secvențe cu o singură copie , așa cum sunt definite prin analiza $C_{sau}t$. care par a fi necodificatoare . Acestea includ multe cazuri de ceea ce numim pseudogene. Acestea sunt secvențe de ADN care reprezintă rămășițe evolutive ale unor copii duplicate ale genelor care au suferit modificări mutaționale semnificative . Prin urmare , deși prezintă o oarecare omologie cu gena lor părinte, ele nu sunt de obicei transcrise din cauza inserțiilor și delețiilor care au avut loc de-a lungul structurii lor .

Deși proporția genomului alcătuită din ADN repetitiv variază între organisme, există o caracteristică care pare să fie comună: *doar o parte foarte mică a genomului codifică de fapt proteinele.* De exemplu, cele 20.000 până la 30.000 de gene care codifică proteine din ariciul de mare ocupă mai puțin de 10 % din genomul său . La *Drosphila* , Doar 5-10% din genomul lor este ocupat de gene care codifică proteine. La specia umană, se pare că regiunile care codifică cele aproximativ 20.000 de gene funcționale pe care se estimează că le avem ocupă doar aproximativ 2 % din secvența totală de ADN care alcătuiește genomul .

Studiul diferitelor forme de ADN repetitiv ne - a sporit semnificativ înțelegerea organizării genomului . În capitolul următor , vom explora organizarea genelor pe cromozomi .

EXPLORARE
DE GENOMICĂ

rales del genoma humano

Área de estudio. Exploración de la Genómica

Baza de date cu variante genomice: variații structurale

ȘI

În acest capitol, ne-am concentrat asupra detaliilor structurale ale cromozomilor *și* în organizarea secvenței de ADN în cromozomi . După cum am discutat în Capitolul 6, am aflat că segmente mari de ADN *și* O serie de gene pot varia foarte mult în ceea ce privește numărul de copii pe care le au datorită duplicărilor , creând ceea ce se numesc variații ale numărului de copii (CNV). În prezent, sunt în desfășurare numeroase studii pentru a identifica și cartografia CNV-urile , în scopul de a găsi potențiale tulburări asociate cu acestea . Până în prezent , aproximativ 2.000 de CNV-uri au fost identificate în genomul uman , *iar* estimările sugerează că ar putea exista încă câteva mii în cadrul populației umane. În acest exercițiu de explorare genomică, vom vizita Baza de date a variantelor genomice (DGV), care oferă un rezumat în continuă expansiune al variațiilor structurale din genomul uman, inclusiv CNV-urile.

■ **Exercițiul I. Baza de date cu variante genomice**

1. Accesați baza de date DGV la **http://projects.tcag.ca/variation .** Faceți clic pe fila *Despre proiect* pentru a afla mai multe despre obiectivul DGV .
2. Informațiile conținute în DGV pot fi vizualizate cu ușurință făcând clic pe cromozomul de interes, utilizând funcția *View Data by Chromosome (Vizualizare date după cromozom)* . sau făcând clic pe un cromozom utilizând *funcția Vizualizare date după genom.*
3. Faceți clic pe un cromozom care vă interesează , utilizând funcția *Vizualizare date după cromozom.* Va apărea un tabel care va afișa mai multe coloane de date , inclusiv :
   - *Locus:* Arată locusul CNV , inclusiv perechile de baze pe care le cuprinde variația.
   - *Reper:* prezintă diferite variații CNV pentru un anumit locus.
   - *ID variație :* oferă un număr de identificare unic pentru fiecare variație.
   - *Tip de variație:* Adnotarea „număr de copie ” este prezentă . Majoritatea variațiilor din această bază de date sunt CNV . Variațiile cunoscute ca fiind inserții sau deleții și bazate pe modificări relativ mici (câteva baze) sunt etichetate „ InDel”. Inversiile sunt etichetate „ Inv ”.
   - *Citobandă:* indică locația variației în cadrul modelului de bandare cromozomială .
   - *Poziție (Mb):* Arată locația relativă în cadrul cromozomului în megabaze (Mb) .
   - *Gene cunoscute în locus :* listează genele situate la un anumit CNV.
4. Să analizăm un grup specific de variații ale CNV-urilor. Este puțin probabil ca multe CNV-uri să afecteze fenotipul , deoarece implică zone mari de secvențe care sunt fie necodificatoare , fie nereglementare . Cu toate acestea, au fost identificate și variații ale CNV- urilor care conțin gene , inclusiv variante care conțin gene asociate cu boala Alzheimer , boala Parkinson și alte tulburări.

Genele defensinei (DEF) fac parte dintr- o familie numeroasă de gene cu un grad ridicat de duplicare. Pentru a afla mai multe despre genele DEF și CNV-urile , utilizați caseta *Căutare prin cuvinte cheie* pentru a căuta gene *DEF* (asigurați-vă că bifați *nr.* (faceți clic pe butonul corespunzător opțiunii de căutare „ Potrivire *exactă ”).* Va apărea o pagină cu rezultatele căutării cu o listă de variații CNV . Faceți clic pe unul dintre linkurile afișate . Partea de sus a fiecărui raport conține grafice care indică poziția fiecărui CNV pe un cromozom. Derulați în jos pe pagină până când vedeți eticheta „ Gene *cunoscute ”* . Faceți clic pe diferitele gene DEF listate în categoria „ Gene cunoscute ” , ceea ce vă va duce la site-ul *Entree* . De la *Centrul - Național pentru Informații Biotehnologice* (NCBI), care conține o cantitate mare de informații despre aceste gene , puteți răspunde la următoarele întrebări . Faceți acest lucru pentru diverse CNV-uri care conțin DEF pe diferiți cromozomi pentru a localiza informațiile de care veți avea nevoie pentru răspunsurile dumneavoastră.

Pe ce cromozomi ați găsit variații CNV care conțin gene DEF ?

a) Ce ai învățat despre funcția - produselor genei DEF ? Ce fac proteinele DEF ?

b) Variațiile genotipurilor *DEF* și expresia genelor DEF la oameni au fost legate de diverse boli umane . Furnizați exemple de tipuri de boli afectate de variațiile genotipurilor DEF .

c) Explorați DGV pentru a găsi un cromozom de interes și pentru a obține informații despre CNV-urile care au fost mapate pe cromozomul respectiv . Încercați funcția *Vizualizare date după genom* , care vă va afișa hărți ale fiecărui cromozom, indicând diferite variații . Pentru CNV-uri (afișate cu albastru), dacă faceți clic pe CNV, veți fi direcționat către locusul său din cadrul cromozomului.

STUDIU DE CAZ | Arta ca inspirație pentru învățare

SAU Un student la genetică aflat în vizită la un muzeu a văzut o pictură de Goya care înfățișa o femeie cu un nou-născut în poală . Bebelușul avea brațe și picioare foarte scurte , precum și anomalii faciale. Întrebându-se dacă aceste caracteristici s-ar putea datora unei tulburări genetice, studentul a făcut niște cercetări online , care au dus la descoperirea faptului că bebelușul ar putea avea sindromul Roberts (SBR), o trăsătură autozomal recesivă rară. În cursul cercetărilor lor, au aflat că celulele din SBR au erori mitotice, inclusiv separarea prematură a centromerilor și a altor regiuni heterocromatice ale cromozomilor omologi în metafază, mai degrabă decât în anafază. Drept urmare, cromozomii din metafază au un aspect rigid, de „șină de cale ferată”. S-a demonstrat că SBR este cauzat de alele mutante ale *genei ESCO2,* care funcționează în timpul diviziunii celulare.

Studentul a scris o listă de întrebări pe care dorea să le cerceteze în încercarea de a înțelege mai bine această tulburare. Cum ați răspunde la aceste întrebări?

1. Ce au în comun centromerii și alte regiuni heterocromatice care le permite să producă acest aspect?
2. Care ar putea fi rolul proteinei codificate de *ESCO2,* care în formă mutantă ar putea provoca aceste modificări în cromozomii mitotici?
3. Cum ar putea separarea prematură a centromerelor cauza problemele observate în RBS?

Puncte de rezumat

de studiu la www.masteringgenetics.com

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona

1. Cromozomii bacteriofagilor și bacteriilor, spre deosebire de cromozomii eucariotelor, nu au în mare parte proteine asociate, sunt mult mai mici și, cu unele excepții, sunt compuși din ADN circular .
2. Cromozomii politeni și cei în perie sunt exemple de structuri specializate care ne-au sporit cunoștințele despre organizarea și funcția genetică, cu mult înainte de apariția tehnologiei pe care biologii moleculari moderni o au la dispoziție astăzi.
3. Cromatina eucariotă este o nucleoproteină organizată în unități repetitive numite nucleozomi, care sunt alcătuite din aproximativ 200 de perechi de baze de ADN, un octamer cu patru tipuri de histone și o histonă linker.
4. Nucleozomii oferă un mecanism pentru compactarea cromatinei în nucleu. Diverse forme de modificare chimică , cum ar fi acetilarea și metilarea, pot altera nivelul de compactare, un proces numit remodelare a cromatinei , care este esențial pentru replicarea și transcripția ADN-ului .
5. Exemple care ilustrează heterocromatina, condensată prematur în interfază și în mare parte inertă genetic, includ regiunile centromerice și telomerice ale cromozomilor eucarioți, cromozomul Y și corpii Barr.
6. Tehnicile de bandare a cromozomilor oferă o modalitate de a subdiviza și identifica regiuni specifice ale cromozomilor cei mai mitotici.
7. Genomurile eucariote prezintă o organizare complexă a secvenței lor, caracterizată prin numeroase categorii de ADN repetitiv, constând fie din repetiții în tandem grupate în diferite regiuni ale genomului , fie din secvențe unice dispersate în mod repetat și aleatoriu în tot genomul.
8. Cea mai mare parte a ADN-ului din majoritatea genomurilor eucariote nu codifică gene funcționale. La oameni, de exemplu, aproximativ 2% din genom este folosit pentru a codifica cele 20.000 de gene pe care le conține.

IDEI ȘI SOLUȚII

Un organism unicelular necunoscut a fost descoperit trăind la adâncimi mari pe fundul oceanului. Nucleul său conținea un singur cromozom liniar format din 7 x 10^6 *Perechi de nucleotide ADN legate de trei tipuri de proteine asemănătoare histonelor. Luați în considerare următoarele întrebări:*

1. O scurtă digestie cu nuclează micrococică a produs fracții de ADN de 700 , 1.400 și 2.100 de perechi de baze . Preziceți ce reprezintă aceste fracții . Ce concluzii se pot trage ?

   Soluție. Fibra de cromatină poate fi compusă dintr-o varietate de nucleozomi care conțin 700 de perechi de baze ADN. Fracțiunile de 1.400 și 2.100 de perechi de baze reprezintă, respectiv , doi și trei nucleozomi uniți. Digestia enzimatică ar fi putut fi incompletă, rezultând aceste două fracții.

2. Analiza nucleozomilor individuali a relevat că fiecare unitate conținea o copie a fiecărei proteine și că ADN- ul scurt de legătură nu avea nicio proteină atașată. Dacă întregul cromozom este alcătuit din nucleozomi (ignorând ADN -ul de legătură), câți nucleozomi există și câte proteine sunt necesare pentru a-i forma?

   Soluție. Deoarece cromozomul conține 7 x 10^2 perechi de baze de ADN și deoarece fiecare nucleozom conține 7 x 10^2 perechi de ^{baze} , numărul de nucleozomi este egal cu:

   7 x 10*77 x $^{10^2}$ = 10 '* nucleozomi

   , ^{13}cromozomul conține 10 ^{14}copii ale fiecăreia dintre cele trei proteine, adică conține un total de ^{3} x 10^4 proteine.

   de două ori volumul ocupat de nucleozom față de toate celelalte eucariote cunoscute , iar lungimea axei nucleozomului era de două ori mai mare. Comparați gradul de compactare (numărul de spire per nucleozom) al nucleozomilor acestui organism cu cel al altor eucariote.

   Soluție. Acest organism compactează un fragment de ADN format din 35 de rotații complete ale helixului (700 de perechi de baze pe nucleozom / 20 de perechi de baze pe rotație) în fiecare nucleozom. Un eucariot normal compactează un fragment de ADN format din 20 de rotații complete ale helixului (200 de perechi de baze pe nucleozom / 10 perechi de baze pe rotație) într- un nucleozom care are jumătate din volumul organismului analizat. Prin urmare, gradul de compactare este mai mic la acest din urmă organism.

4. În cromozomul acestui nou organism, nu are loc nicio încolăcire sau compactare suplimentară . Comparați această situație cu cea a unui cromozom eucariot . Credeți că un cromozom uman $^{cu\ o}$ lungime de 7 x 10^{10} perechi de baze va forma, în timpul interfazei , o fibră de cromatină mai lungă sau mai scurtă ?

   Soluție. Cromozomul eucariot conține un alt nivel de condensare sub formă de solenoizi, care sunt spirale compuse din nucleozomi conectați prin ADN linker . Solenoizii condensează fibra eucariotă de aproximativ cinci ori . Lungimea cromozomului în organismul analizat este compactată în $10^{1\ nucleozomi}$, fiecare având o lungime axă de două ori mai mare decât ^{cea} a fibrei eucariote . Fibra eucariotă este alcătuită din 7 x 10^6 / ^{2} x 10^2 . = 3,5 x 10^4 nucleozomi, adică de 3,5 ori mai mulți decât organismul analizat. Cu toate acestea, este compactat cu un factor de cinci în fiecare solenoid. Prin urmare, cromozomul organismului analizat formează o fibră de cromatină mai lungă .

13 Analizele ulterioare au arătat că ADN-ul organismului era un Helixul dublu era similar cu cel al modelului Watson -Crick , dar conținea 20 de perechi de baze în fiecare rotație completă a helixului dreptaci. Dimensiunea fizică a nucleozomului era exact...

Problemas y preguntas para la discusión

CUM AM SCĂPAT

I. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care este organizat ADN-ul la nivel cromozomial. Pe parcurs , am întâlnit numeroase ocazii de a analiza metodele și raționamentele care au condus la o mare parte din această concluzie. Pe baza informațiilor furnizate în acest capitol, cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?
(a) De unde știm că cromozomii virali și bacterieni sunt în general compuși din molecule circulare de ADN, lipsite de proteine ?
(b) Care este baza experimentală care ne permite să concluzionăm că *pufurile* Sunt cromozomii politenici și buclele celor mai asemănători cromozomilor cu perie zone de transcripție intensă a ARN-ului ?
(c) De unde știm că cromatina eucariotă există sub formă de nucleozomi repetitivi, fiecare compus din aproximativ 200 de perechi de baze și un octamer de histonă?
(d) De unde știm că ADN-ul satelit este alcătuit din secvențe repetitive și că provine din regiunile centromerilor?

2. Comparați dimensiunea cromozomilor bacteriofagilor XY T2 cu cea a E. *coli. Cum se leagă aceasta de dimensiunea și* complexitatea relativă a fagilor și bacteriilor?
3. Descrieți structura cromozomilor polienici gigantici și explicați cum se formează aceștia.
4. Ce proces genetic are loc într- un puf de cromozomi polienici ? Cum putem afla acest lucru experimental?
5. Descrieți structura secvențelor LINE. De ce sunt secvențele LINE numite retrotranspozoni?
6. În timpul cărui proces genetic se găsesc cromozomii perie la vertebrate?
7. De ce putem prezice că organizarea materialului genetic eucariot va fi mai complexă decât cea a virusurilor și bacteriilor?
8. Descrieți succesiunea descoperirilor care au condus la dezvoltarea modelului structurii cromatinei .
9. Descrieți compoziția moleculară și aranjamentul componentelor nudeasomului .
10. Descrieți tranzițiile care au loc pe măsură ce nucleozomii se înfășoară și se pliază pentru a forma o cromatidă.
11. Oferiți o definiție detaliată a heterocromatinei și enumerați cât mai multe exemple posibil.
12. Mamiferele conțin un genom diploid format din cel puțin 10 perechi de baze . Dacă tot acest ADN este sub formă de fibre de cromatină, în care fiecare grup de 200 de perechi de baze se combină cu 9 histone într-un nudeozom și unde fiecare grup de 6 nudeozomi se combină într-un solenoid, realizând o proporție finală de împachetare de 50, determinați (a) numărul total de nudeozomi din fibră, (b) numărul total de molecule de histone care sunt combinate cu ADN-ul în genomul diploid și (c) lungimea combinată a tuturor fibrelor.
13. Să presupunem că o moleculă de ADN viral formează un lanț circular cu o lungime de 50 μm și un diametru uniform de 20 Å . Dacă această moleculă este conținută într-un cap viral sferic cu un diametru de 0,08 μm, se va potrivi molecula de ADN în capul viral, presupunând că molecula este complet flexibilă? Demonstrați răspunsul matematic.
14. Câte perechi de baze există într-o moleculă de ADN- fag T2 ? care are o lungime de 52 m?

I MG) ? Pentru a vedea proiectele și tutorialele atribuite de profesor , consultați www.masteringgenetics.com

Exemple de modificări ale histonei includ acetilarea (prin histon acetiltransferază sau HAT), care este adesea legată de activarea genelor , și deacetilarea (prin histon deacetilaze sau HDAC), care duce adesea la reducerea la tăcere a genelor în heterocromatină. Această heterocromatinizare începe la un situs de nucleație și se răspândește bidirecțional până când întâlnește limite care delimitează zonele reduse la tăcere. Reamintim din Capitolul 4 scurta discuție despre efectul de poziție, în care repoziționarea alelei *w′* La *Drosophila* , translocația sau inversiunea în apropierea heterocromatinei produce activitate w* intermitentă . *În* starea heterozigotă *(w′/w),* apare un ochi pestriț cu pete albe și roșii. Cum ar putea fi explicată variegarea prin efect pozițional în termeni de acetilare și/sau deacetilare a histonei?

15.
16. Având în vedere indiciile că există cel puțin 19.000 de pseudogene în genomul uman și poate doar 21.000 de gene care codifică proteine, unii cercetători sugerează că, pe măsură ce dovezile experimentale sunt rafinate , numărul de pseudogene ar putea depăși în cele din urmă numărul de gene care codifică proteine (Gerstein și Zheng, 2006).
(a) De ce durează mai mult localizarea pseudogenelor decât a genelor care codifică proteine?
(b) Majoritatea pseudogenelor sunt rămășițe deteriorate ale unor gene funcționale anterior și sunt considerate nefuncționale. Cu toate acestea , s -a sugerat că unele pseudogene chiar funcționează . Având în vedere diferitele moduri în care ADN-ul este organizat în cromozomi, cum ar putea funcționa pseudogenele ?
17. Repetițiile în tandem cu număr variabil (VNTR) sunt secvențe de ADN repetitive cu o lungime de aproximativ 15 până la 100 de perechi de baze, care se găsesc atât în interiorul, cât și între gene. De ce sunt utilizate în mod obișnuit în știința criminalistică?
18. O serie de studii recente au stabilit că patogeneza bolilor, indiferent dacă sunt legate de virusuri, cancer, vârstă sau diverse alte cauze, este adesea asociată cu modificări ale metilării ADN-ului. Dacă astfel de modele ar fi considerate biomarkeri pentru diagnosticarea bolilor , ce criterii ați considera cerințe esențiale pentru utilizarea lor?
19. S-a demonstrat că agenții infecțioși, cum ar fi virusurile, exercită adesea un efect dramatic asupra arhitecturii genomului celulei gazdă . În multe cazuri, virusurile induc metilarea secvențelor de ADN ale gazdei pentru a le crește infecțiozitatea . Ce funcții genetice specifice gazdei le considerați cele mai probabile candidate pentru o astfel de metilare de către virusurile care infectează gazda ?
20. Cancerul poate fi definit ca o proliferare anormală a celulelor care sfidează controalele de reglare normale prezente în celulele neafectate. Recent, terapiile de deacetilare a histonei au fost explorate în tratamentul anumitor tipuri de cancer (discutate de Delcuve și colab., 2009). Mai exact , FDA a aprobat inhibitori de deacetilare a histonei (HDAC) pentru tratamentul limfomului cutanat cu celule T. Explicați de ce acetilarea histonei ar putea fi asociată cu cancerul și care este rațiunea utilizării inhibitorilor HDAC în tratamentul anumitor tipuri de cancer .

Problemas extrapicantes

I MG

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

21 Într-un studiu asupra *Drosophila,* două gene normal active, »v' (alela de tip sălbatic a *genei ochiului alb)* și *hsp2f>* (o genă a șocului termic), au fost introduse prin intermediul unui vector plasmidic în regiuni cromozomiale eucromatice și heterocromatice, după care a fost măsurată activitatea relativă a fiecărei gene (Sun et al., 2002). Tabelul următor prezintă o aproximare a datelor rezultate. Ce caracteristică sau caracteristici ale heterocromatinei sugerează datele experimentale?

	Activitate (procent relativ)	
General	Eucromatina	Heterocromatina
hsp26 ce	100%	31%
	100%	8%

ataxie musculară spino-bulbară, ataxie spinocerebeloasă și sindrom X

22. Deși mai sunt multe de învățat despre funcția nucleozomilor și structura și funcția cromatinei , cercetări recente indică faptul că modificarea chimică *in vivo* a histonelor este asociată cu modificări ale activității genelor . Un studiu a constatat că acetilarea H3 și H4 este asociată cu creșteri de 21,1%, respectiv 13,8 % ale activității genelor de drojdie și că heterocromatina de drojdie este hipometilată în raport cu media genomului (Bernstein și colab ., 2000). Speculați asupra semnificației acestor descoperiri în ceea ce privește interacțiunile nucleozom -ADN și activitatea genelor .

23. Într-un articol intitulat *Poziționarea nucleozomilor la furca de replicare* (Poziționarea nucleozomilor la furca de replicare) este descrisă după cum urmează: „atât nucleozomii vechi segregați aleatoriu , cât și octamerii de histone nou asamblați își ocupă rapid pozițiile (în câteva secunde) pe catena de ADN nou sintetizată " (Lucchini și colab., 2002). Având în vedere această afirmație, cum s-ar compara distribuția nucleozomilor și a ADN-ului în cromatina nou replicată ? Cum ar putea fi verificată experimental distribuția nucleozomilor în cromozomii nou replicați ?

24 Genomul uman conține aproximativ 10^{9} copii ale secvenței *Alu* per genom haploid, una dintre cele mai bine studiate clase de elemente dispersate scurt (SINE). Secvențele *Alu* Secvențe A/m specifice au în comun o secvență consens de 282 de nucleotide, urmată de o coadă 3' bogată în adenină (Schmid, 1998). Având în vedere că aproximativ un genom de haplogrup uman conține 3 x 10^{9} perechi de baze, aproximativ câte perechi de baze există între fiecare secvență A/m ?

25. Următoarea diagramă prezintă structura generală a cromozomului bacteriofag Z. Speculați asupra mecanismului prin care, după infectarea unei celule gazdă , aceasta formează un inel închis.

5' GGGCGGCGACCT—regiune cu coarde duble — 3'
3'—regiune dublu catenară—CCCGCCGCTGGA 5'

26 Secvențele de ADN repetate în tandem care conțin o secvență repetată de la una la șase perechi de baze , cum ar fi (GACA), se numesc microsateliți și sunt comune la eucariote. Un grup particular al acestora, repetițiile trinucleotidelor , sunt deosebit de interesante având în vedere rolul lor în unele boli neurodegenerative (boala Huntington, distrofia miotonică , atrofia).

27. Informații suplimentare față de cele furnizate în Problema 26 au furnizat date despre modelul lungimilor repetitive din cadrul genelor . Fiecare valoare din tabelul următor reprezintă numărul de apariții în gene a unui fragil). Următoarele sunt date modificate, derivate din lucrarea lui Loth și colab. (2000) privind localizarea microsateliților între și în interiorul genelor. Ce concluzie generală puteți trage din aceste date?

Procentul de secvențe de ADN microsatelit din cadrul gene și printre ele

Grup taxonomic	În cadrul genelor	Între gene
Primate	7.4	92,6
Rozătoare	33,7	66,3
Artropode	46,7	53,3
Drojdii	77,0	23,0
Alte ciuperci	66,7	33.3

microsatelit cu o lungime specifică a secvenței , între una și șase baze. De exemplu, la primate, o secvență de două nucleotide (cum ar fi GC) apare de 10 ori, iar o secvență de trei nucleotide apare de 1.126 de ori. La fungi, o repetiție de șase nucleotide (cum ar fi GACACC) apare de 219 ori, în timp ce o repetiție de patru nucleotide (cum ar fi G A C A) apare doar de 2 ori. Analizați și interpretați aceste date , indicând ce model general este evident în distribuția diferitelor lungimi ale microsateliților din cadrul genelor. Care ar putea fi semnificația acestui model general?

Distribuția microsateliților pe unitatea de lungime în cadrul genelor

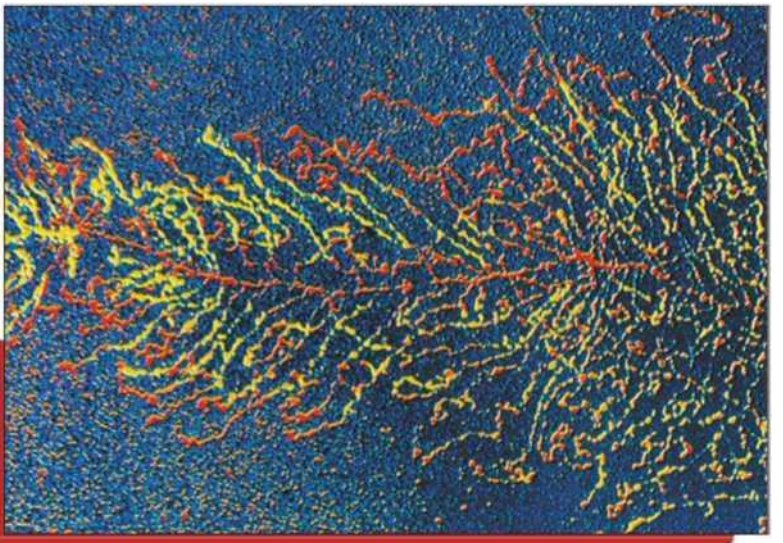
	Lungimea motivului repetat (perechi de baze)					
Grup taxonomic	1	2	3	4	5	6
Primate	49	10	1.126	29	57	244
Rozătoare	62	70	1.557	63	116	620
Artropode	12	34	1.566	0	21	de 591
Drojdii	36	19	706	7	52	330
Alte ciuperci	9	4	381	2	35	de 219

28. Microsateliții sunt utilizați în prezent ca markeri în testele de paternitate. Mai jos este un exemplu de test de paternitate în care au fost utilizați zece markeri microsateliți pentru a analiza probe de la mamă, copilul ei și presupusul tată. Coloana din stânga arată numele locusului microsatelit, iar genotipul fiecărui individ este dat de numărul de repetiții pe care îl are la fiecare locus. De exemplu, la locusul D9S302, mama are 30 de repetiții pe un cromozom și 31 pe celălalt. În cazurile în care o persoană are același număr de repetiții pe ambii cromozomi, este afișată o singură valoare. (Unele valori au zecimale, de exemplu, 20,2, deoarece includ repetiții parțiale pe lângă cele complete.) Presupunând că acești markeri prezintă un model de moștenire mendeliană simplă, poate fi exclus presupusul tată ca sursă a spermei care a produs copilul? De ce sau de ce nu? Explicați.

Locusul microsatelit - localizarea cromozomială	Mamă	Fiu	Presupusul tată
D9S302-9q31-q33	30	31 de ani	32
	31 de ani	32	33 de ani
D22S883-22pter-22qter	17 ani	20.2	20.2
	22	22	
D18S535-18q12.2-q12.3	12	13	11
	14	14	13
D7SI 804-7pter-7qter	27	26	26
	30	30	27
D3S2387-3p24.2.3pter	23 de ani	24	20,2
	25,2	25,2	24
D4S2386-4pter-qter	12	12	12
			16
D5S1719-5pter-5qter	11	10,3	10
	11,3	11	10,3
CSF1PO-5q33.3.q34	11	11	10
		12	12
FESFPS-15q25-15qrer	11	12	10
	12	13	13
TH01-11p15.5	7	7	7

29. La capătul brațului scurt al cromozomului 16 uman (16p) se află mai multe gene asociate cu boli, inclusiv talasemia și boala renală polichistică . Când este secvențiată această regiune a cromozomului 16 , se constată că regiunile codificatoare sunt foarte apropiate de secvențele asociate telomerilor . Ar putea exista o relație între localizarea acestor gene și prezența secvențelor asociate telomerilor? Ce informații suplimentare despre aceste gene ar putea fi utile pentru analiza noastră ?

Micrografie electronică a unui segment de ADN în timpul transcripției.



13

Codul genetic și transcripția

CONCEPTE CAPITOL

Informația genetică este stocată în ADN folosind un cod triplet care este aproape universal pentru toate ființele vii de pe Pământ .

Codul genetic este inițial transferat de la ADN la ARN în timpul procesului de transcripție .

►►Odată transferat în ARN, codul genetic se prezintă sub formă de codoni tripleți, care sunt seturi de câte trei nucleotide în care fiecare nucleotid este unul dintre cele patru tipuri de ribonucleotide care alcătuiesc ARN-ul.

Cele patru ribonucleotide ale ARN-ului, analog unui alfabet de patru litere , pot fi aranjate în 64 de secvențe diferite de câte trei litere .

Majoritatea tripletelor de ARN codifică unul dintre cei 20 de aminoacizi prezenți în proteine, care sunt produsele finale ale majorității genelor.

►► Mai mulți codoni acționează ca semnale care inițiază sau termină sinteza proteinelor.

►► Procesul de transcripție la eucariote este similar , dar mai complex decât la procariote și la bacteriofagii care le infectează.

C. După cum am văzut în Capitolul 10, structura ADN-ul este format dintr-o secvență liniară de dezoxiribonucleotide. În cele din urmă, această secvență dictează elementele constitutive ale proteinelor, produsul final al majorității genelor. O întrebare centrală este modul în care informațiile stocate sub formă de acid nucleic pot fi decodificate într-o proteină. Figura 13.1 oferă un rezumat simplificat al modului în care are loc acest transfer de informații , al cărui rezultat final este expresia genelor. În prima etapă, informațiile găsite pe una dintre cele două catene de ADN (catena matriță) sunt transferate către o secvență de ARN complementară prin procesul de transcripție. Odată sintetizat, acest ARN acționează ca o moleculă „mesageră", transportând informațiile codificate în afara nucleului - de unde și denumirea sa, *ARN mesager* (ARNm). ARNm-urile se asociază apoi cu ribozomii, unde are loc decodificarea în proteine.

În acest capitol ne vom concentra asupra fazelor inițiale ale expresiei genelor, punând două întrebări importante . În primul rând, cum este codificată informația genetică? Și în al doilea rând, cum se produce aceasta?

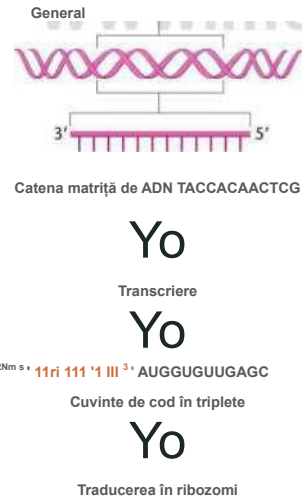


FIGURA 13.1 Diagrama de flujo que ilustra cómo la información genética codificada en el ADN produce proteínas.

de la ADN la ARN, definind astfel procesul de transcripție? După cum vom vedea, investigații analitice ingenioase au stabilit că codul genetic este scris în unități de trei litere, tripletele de ribonucleotide prezente în ARNm reflectând informațiile stocate în gene . Majoritatea cuvintelor scrise în codul triplet direcționează încorporarea unui aminoacid specific în timpul sintezei proteinelor . Așa cum s-ar putea prezice pe baza complexității replicării ADN-ului (vezi Capitolul 11) , transcripția este, de asemenea, un proces complex care depinde de o enzimă polimerază principală și de o colecție de proteine suport . Vom explora ce se știe despre transcripție la bacterii și apoi vom compara acest model procariot cu transcripția la eucariote.

Vom continua discuția noastră despre expresia genelor întrebându-ne cum are loc traducerea și apoi descriind structura și funcția proteinelor (Capitolul 14) . Împreună, aceste două capitole oferă o imagine detaliată a geneticii moleculare , care este fundamentală pentru înțelegerea organismelor vii.

13.1

Codul genetic folosește baze ribonucleotidice drept „litere"

Înainte de a analiza diversele abordări analitice care au condus la înțelegerea actuală a codului genetic, să rezumăm aspectele generale care îl caracterizează:

1. Codul genetic este scris liniar folosind bazele ribonucleotidice care alcătuiesc moleculele de ARNm drept „litere". Secvența ribonucleotidelor provine din bazele nucleotidice complementare ale ADN - ului .
2. Fiecare „cuvânt" din ARNm este alcătuit din trei litere nucleotidice ri , de unde și denumirea de cod triplet. Cu unele excepții, fiecare grup de *trei* ribonucleotidele, numite codon, specifică un aminoacid.
3. Codul este lipsit de ambiguitate, în sensul că fiecare triplet specifică doar *unul* un singur aminoacid.
4. Codul este degenerat, în sensul că un anumit aminoacid poate fi specificat de mai mult de un codon. Acesta este cazul pentru 18 din cei 20 de aminoacizi.
5. Codul conține un semnal de „ start " și trei semnale de „end", care sunt triplete care încep, respectiv termină traducerea .
6. Codul nu folosește nicio punctuație internă (cum ar fi virgula). Prin urmare, se spune că

nu are virgule. Odată ce începe traducerea ARNm , codonii sunt citiți în ordine și fără întrerupere (până când se atinge un semnal de oprire).

7. Codul nu se suprapune. Odată ce începe traducerea, fiecare ribonucleotidă din ARNm devine parte a unui singur triplet.
8. Secvența de codoni dintr-o genă este coliniară cu secvența de aminoacizi care alcătuiește proteina codificată.
9. Codul este aproape universal. Cu puține excepții, aproape toți virusurile, procariotele, arheele și eucariotele folosesc același dicționar de codare.

13.2

Studiile inițiale au stabilit modelele de funcționare de bază ale codului

La sfârșitul anilor 1950 , înainte de a deveni clar că ARNm servește ca intermediar în transferul informației genetice de la ADN la proteine, cercetătorii credeau că ADN-ul ar putea codifica sinteza proteinelor mai direct . Întrucât ribozomii fuseseră deja identificați , convingerea inițială a fost că informațiile din ADN erau transferate în nucleu către ARN-ul ribozomal , care servea drept șablon pentru sinteza proteinelor în citoplasmă. Acest concept s-a dovedit curând a fi inacceptabil, pe măsură ce au început să se acumuleze dovezi care indicau existența unui șablon intermediar instabil . ARN-ul ribozomal, pe de altă parte, era extrem de stabil. În 1961, François Jacob și Jacques Monod au postulat existența ARN-ului mesager (ARNm). Odată ce ARNm a fost descoperit, a devenit clar că, deși informațiile genetice sunt stocate în ADN, codul care este tradus în proteine se află în ARN. Întrebarea fundamentală, așadar, era: cum ar putea doar patru litere - cele patru nucleotide - să specifice 20 de cuvinte, aminoacizii ? Oamenii de știință au luat în considerare posibilitatea ca codurile ADN să se suprapună în așa fel încât fiecare nucleotid să facă parte din mai multe cuvinte de cod , dar au început să acumuleze dovezi care erau incompatibile cu restricțiile pe care un astfel de cod le-ar impune asupra secvențelor de aminoacizi rezultate . Vom discuta o parte din aceste dovezi mai târziu .

Natura tripletă a codului

La începutul anilor 1960 , Sidney Brenner a argumentat , pe baze teoretice, că codul ar trebui format din triplete, deoarece cuvintele de trei litere reprezintă lungimea minimă necesară pentru a specifica 20 de aminoacizi folosind patru litere diferite. De exemplu, un cod de patru nucleotide, combinând cuvinte de două litere, oferă doar 16 cuvinte cod distincte (4²). Un cod triplet oferă 64 de cuvinte (4³) și este, prin urmare, suficient pentru cele 20 de cuvinte necesare și, în același timp, considerabil mai puțin greoi decât un cod de patru litere (4⁴), care ar permite - specificarea a 256 de cuvinte.

Munca experimentală ingenioasă a lui Francis Crick, Leslie Barnett, Brenner și R.J. Watts-Tobin a furnizat prima dovadă solidă că codul era compus din tripleți. Acești cercetători au indus mutații de inserție și deleție la locusul *rii* al fagului T4 *(vezi* Capitolul 6). Fagul de tip sălbatic provoacă liză și chelie la tulpinile B și K12 de *E. coli.* Cu toate acestea , mutațiile *rii* previn acest proces de infecție la tulpina K12, permițând în același timp infecția la tulpina B. Crick și colegii săi au folosit colorantul acridinic *proflavină* pentru a induce mutațiile. Acest agent mutagen se intercalează în dubla helix a ADN-ului, provocând inserția sau deleția unuia sau mai multor nucleotide în timpul replicării. După cum se arată în Figura 13.2(a), inserția unui singur nucleotid provoacă o deplasare a cadrului de citire (secvența contiguă de nucleotide).

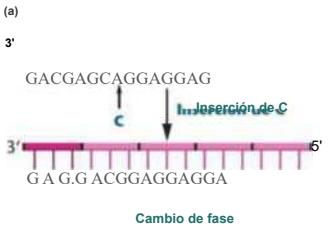


FIGURA 13.2 Efectul mutațiilor de schimbare a cadrului de citire asupra unei secvențe de ADN constând din tripletul repetat GAG. (a) Inserția unui singur nucleotid deplasează toți tripleții ulteriori, modificând cadrul de referință. (b) Inserția a trei nucleotide modifică doar doi tripleți, după care se restabilește cadrul de referință original.

Aceste mutații codifică un polipeptid, modificând toți codonii ulteriori (codonii din dreapta inserției în figură). Aceste mutații se numesc mutații de schimbare a cadrului de citire . După traducere, secvența de aminoacizi a proteinei codificate va fi modificată radical, începând din punctul în care a avut loc mutația. Când aceste mutații apar la locusul rii , *T4* nu este reprodus în *E. coli K12.*

Crick și colegii săi au argumentat că, dacă fagii cu mutații induse de schimbare a cadrului de citire ar fi tratați din nou cu proflavină, ar apărea inserții sau deleții suplimentare . O a doua mutație ar putea duce la un fag inversat, care s-ar comporta ca un fag de tip sălbatic și ar infecta cu succes *E. coli.* Kl 2. De exemplu, dacă mutantul original conținea o inserție (+), un al doilea eveniment care provoacă o deleție (—) în apropierea inserției ar restabili faza de citire originală . În mod similar, un eveniment care produce o inserție (+) ar putea corecta o deleție originală (—).

Studiind numeroase mutații de acest tip, acești cercetători au reușit să compare combinații ale diferitelor mutații de schimbare a cadrului de citire în cadrul aceleiași secvențe de ADN . Ei au descoperit că diferite combinații de plus (+) și minus (—) au cauzat revenirea la comportamentul de tip sălbatic. Observații ulterioare au scos la iveală numărul de nucleotide care alcătuiesc codul genetic. Când două nucleotide plus (+) sau două minus (—) erau prezente împreună, cadrul de citire corect *nu era* restabilit . Acest lucru contrazicea codul din două litere (dublet). Cu toate acestea, când trei nucleotide plus (+) [Figura 13.2(b)] sau trei nucleotide minus (—) erau prezente împreună, cadrul de citire original era restabilit . Aceste observații au susținut puternic ideea că codul era compus din tripleți.

Natura nesuprapusă a codului

în cazul niciunei transcripții, codul nu se putea suprapune . De exemplu, presupunând un cod triplet, Brenner a luat în considerare restricțiile pe care le-ar avea dacă s-ar suprapune. El a luat în considerare secvențe teoretice de nucleotide care ar codifica o proteină formată din trei aminoacizi. De exemplu, dacă secvența de nucleotide ar fi GTACA și părți ale codonului mijlociu, TAC, ar fi fost partajate de codonii exteriori , GTA și ACA, atunci doar anumiți aminoacizi (cei cu codoni care se termină în TA sau încep cu AC) ar putea fi găsiți adiacenți aminoacidului codificat de codonul mijlociu . Această considerație l-a determinat pe Brenner să concluzioneze că, dacă codul s-ar suprapune, compozițiile secvențelor tripeptidice din proteine ar fi oarecum limitate.

De exemplu, atunci când se ia în considerare un anumit - aminoacid central , teoretic ar fi posibile doar 16 combinații (2^4) de câte trei aminoacizi (secvențe tripeptidice) . Căutând secvențele de aminoacizi [ale] proteinelor cunoscute la acea vreme , Brenner nu a găsit astfel de restricții asupra secvențelor tripeptidice. Pentru fiecare aminoacid central, a găsit mult mai mult de 16 tripeptide diferite. Această observație i-a permis să concluzioneze că codul nu se suprapune.

Un al doilea argument important împotriva codului suprapus se referă la efectul unei singure modificări a unui nucleotid. În cazul codului suprapus, o astfel de mutație punctuală ar afecta doi aminoacizi adiacenți. Cu toate acestea, mutațiile din genele care codifică proteina anvelopei virusului mozaic al tutunului (TMV) , hemoglobina umană și enzima bacteriană triptofan sintază au arătat invariabil modificări doar la un singur aminoacid .

Al treilea argument împotriva codului suprapus a fost prezentat de Francis Crick în 1957, când a prezis că ADN-ul nu servește drept șablon direct pentru formarea proteinelor . Crick a argumentat că orice afinitate între nucleotide și un aminoacid ar necesita legături de hidrogen . Din punct de vedere chimic , însă, astfel de afinități specifice păreau improbabile . În schimb, Crick a propus că ar trebui să existe o „ moleculă adaptor ” care s - ar putea lega covalent de aminoacid și să formeze legături de hidrogen cu secvența de nucleotide . Cu un cod suprapus, diverși adaptori ar trebui cumva să se suprapună unul cu celălalt la situsurile nucleotidice în timpul traducerii , ceea ce face ca procesul , în opinia lui Crick , să fie excesiv de complex și posibil ineficient . După cum vom vedea mai târziu în acest capitol, predicția lui Crick a fost corectă - *ARN-ul de transfer (ARNt)* Servește ca adaptor în sinteza proteinelor, iar ribozomul găzduiește două molecule de ARNt în același timp .

Luate împreună, argumentele lui Crick și Brenner sugerează cu tărie că, în timpul traducerii, codul genetic nu se suprapune . Acest concept a fost confirmat , fără excepție .

Natura degenerată, fără virgule, a codului

Între 1958 și 1960, informațiile despre codul genetic au continuat să se acumuleze. Pe lângă propunerea adaptorului , Crick a emis ipoteza , pe baza dovezilor genetice, că codul nu *are virgule* . Adică , el credea că nu există semne de punctuație interne în faza de citire . Crick a speculat, de asemenea , că doar 20 dintre cei 64 de codoni posibili specificau un aminoacid și că restul de 44 nu aveau niciun cod atribuit.

S-a înșelat Crick în legătură cu cei 44 de codoni „goli"? Sau este codul degenerat, adică mai mult de un codon specifică același aminoacid? Studiile privind deplasările cadrului de citire al lui Crick au sugerat că, de fapt, contrar propunerii sale inițiale, codul este degenerat. În cazurile în care funcția de tip sălbatic este restabilită - adică (+) cu (-), (++) cu (-) și (++ ∬) cu (-) - cadrul de citire original este recuperat.

Totuși, între inserție și deleție, pot exista numeroși codoni care rămân defazați. Dacă 44 din cei 64 de codoni posibili ar fi goi, pe care îi numim codoni stop, și nu ar specifica niciun aminoacid, ar fi foarte probabil ca cel puțin un codon gol să apară în lanțul nucleotidic care rămâne defazat. Dacă unul dintre acești codoni stop ar fi întâlnit în timpul sintezei proteinelor , procesul s-ar opri probabil sau s-ar termina în acel punct. În acest caz, produsul locusului *rii* nu ar fi generat și restaurarea nu ar avea loc. Întrucât diversele combinații mutante puteau fi reproduse în *E. coli* K12, Crick și colaboratorii săi au concluzionat că, după toate probabilitățile, majoritatea, dacă nu toți, dintre cei 44 de codoni rămași nu erau goi. Prin urmare, au dedus că codul genetic era degenerat. După cum vom vedea, acest raționament s-a dovedit a fi corect.

13.3

Munca lui Nirenberg, Matthaei și a altora a dus la descifrarea codului

În 1961, Marshall Nirenberg și J. Heinrich Matthaei au fost primii care au caracterizat secvențe codificatoare specifice, care au servit drept piatră de temelie pentru analiza completă a codului genetic. Succesul lor, precum și cel al altor cercetători care au adus, de asemenea, contribuții importante la descifrarea codului genetic, a constat în utilizarea a două instrumente experimentale: un sistem *de sinteză proteică in vitro* . și enzima polinucleotid fosforilază, care permite producerea de ARNm sintetic . Aceste ARNm au servit ca șabloane pentru sinteza polipeptidelor în sistemul fără celule.

Sinteza polipeptidelor într-un sistem fără celule

În sistemele de sinteză a proteinelor fără celule , aminoacizii pot fi încorporați în lanțurile polipeptidice. Acest proces începe dintr -un amestec *in vitro* , care conține toți factorii necesari pentru sinteza proteinelor în celulă : ribozomi , ARNt, aminoacizi și alte molecule esențiale pentru traducere (*vezi* Capitolul 1, 4). Pentru a permite oamenilor de știință să urmărească (sau să urmărească) progresul sintezei proteinelor, unul sau mai mulți aminoacizi trebuie să fie radioactivi. În cele din urmă, trebuie adăugat un șablon de ARNm pentru traducere .

În 1961, ARNm nu putea fi încă izolat. Cu toate acestea, utilizarea enzimei polinucleotidice fosforilază a permis sinteza artificială a șabloanelor de ARN, care puteau fi adăugate la sistemul celular . Această enzimă, izolată din bacterii, catalizează reacția prezentată în Figura 13.3 . Descoperită în 1955 de Marianne Grunberg-Manago și Severo Ochoa, funcția metabolică a enzimei în celulele bacteriene este de a degrada ARN-ul. Cu toate acestea, *in vitro,* cu concentrații mari de difosfați ribonucleozizi, reacția poate fi „forțată" în direcția opusă pentru a sintetiza ARN, așa cum se arată în figură.

Spre deosebire de ARN polimerază (care construiește ARNm in vivo), polinucleotida fosforilaza nu necesită o matriță ADN. Prin urmare, ordinea în care sunt adăugate ribonucleotidele este aleatorie , *în* funcție de concentrația relativă a celor patru ribonucleotid difosfați adăugați în amestecul de reacție . Probabilitatea inserării unei anumite ribonucleotide este proporțională cu disponibilitatea acelei molecule în raport cu celelalte ribonucleotide disponibile . Acest punct este *crucial pentru înțelegerea lucrării lui Nirenberg și a altor oameni de știință* discutate *în secțiunea următoare* .

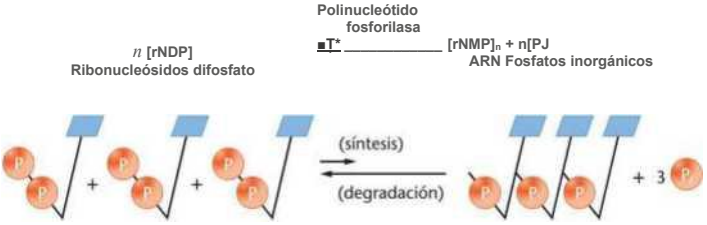


FIGURA 13.3 Reacción catalizada por la enzima polinucleótido fosforilasa. Observe que el equilibrio de la reacción favorece la degradación del ARN, pero la reacción puede «forzarse» en la dirección que favorece a la síntesis.

Luate împreună, sistemul celular fără celule pentru sinteza proteinelor și disponibilitatea ARNm sintetic au oferit un mijloc de a descifra compoziția ribonucleotidelor a diferiților codoni care codifică aminoacizi specifici.

Coduri homopolimeri

În experimentele lor inițiale, Niremberg și Matthaei au sintetizat - homopolymeri de ARN - molecule de ARN care conțin un singur tip de ribonucleotidă - și i-au folosit pentru a sintetiza polipeptide *in vitro.* Cu alte cuvinte, ARNm-ul pe care l-au folosit în sistemul lor de sinteză a proteinelor fără celule a fost fie UUUUUU..., AAAAAA..., CCCCCC..., fie GGGGGG... Au testat fiecare dintre aceste tipuri de ARNm pentru a vedea ce aminoacid, dacă există, a fost încorporat în proteinele nou sintetizate. Metoda lor a implicat efectuarea multor sinteze experimentale cu fiecare homopolymer. S-au asigurat întotdeauna că toți cei 20 de aminoacizi erau disponibili, dar pentru fiecare experiment, au asociat un marker radioactiv cu un aminoacid diferit, permițându -le să determine ce aminoacid a fost încorporat în polipeptida rezultată.

De exemplu, în experimente care au utilizat fenilalanină- HCl (Tabelul 13.1), Niremberg și Matthaei au concluzionat că homopolimerul ARN UUUUU... (acid poliuridilic) direcționează încorporarea doar [a] fenilalaninei în homopolimerul peptidic polifenilalanină. Presupunând validitatea codului triplet, au făcut prima atribuire specifică de codon: UUU codifică fenilalanina. Efectuând experimente similare, au descoperit rapid că AAA codifică lizina, iar CCC codifică prolina. Poly-G nu a servit ca șablon funcțional, probabil pentru că molecula se pliază înapoi pe sine. Prin urmare, atribuirea pentru GGG a trebuit să aștepte până când alte metode au devenit disponibile.

Rețineți că atribuirea specifică a codonilor în tripleți a fost posibilă doar datorită utilizării homopolimerilor . În această metodă, se cunoaște doar compoziția generală a nucleotidelor din șablon , dar nu și ordinea specifică a nucleotidelor din fiecare triplet; cu toate acestea, deoarece trei litere identice pot avea o singură secvență (de exemplu, UUU), au putut fi identificați trei dintre codonii propriuzișI, corespunzând fenilalaninei, lizinei și prolinei.

Incorporarea fenilalaninei- ^{14C} într-o proteină

TABELUL 13.1

ARNm artificial	Radioactivitate (numărări/min)
Nici unul	44
Polul U	39.800
Polonezi A	50
Poliție	38 de ani

Sursa: Nirenberg și Matthaei (1961).

Amestec de copolimeri

Având în vedere succesul inițial al acestor tehnici, Niremberg și Matthaei, precum și Ochoa și colaboratorii săi , au apelat la utilizarea heteropolimerilor de ARN. În experimentele lor ulterioare, au folosit doi sau mai mulți ribonucleozid difosfați diferiți în combinație pentru a forma mesajul artificial. Acești cercetători au argumentat că, dacă se cunoaște proporția relativă a fiecărui tip de ribonucleozid difosfat din ARNm-ul lor sintetic , se poate prezice frecvența fiecăruia dintre posibilii codoni tripleți pe care îi conține. Dacă ARNm - ul este apoi adăugat la sistemul celular liber și se determină procentul fiecărui aminoacid specific prezent în polipeptida rezultată , rezultatele pot fi analizate și se poate prezice compoziția tripleților care specifică acei aminoacizi anumiți .

Această abordare este ilustrată în Figura 1.3.4 . Presupunem că doar A și C sunt utilizate pentru a sintetiza ARNm într - un raport de 1A:5C . Acum, inserarea unei ribonucleotide în orice poziție din molecula de ARN în timpul sintezei sale este determinată de raportul A:C . Prin urmare , probabilitatea ocupării fiecărei poziții este de 1/6 pentru un A și de 5/6 pentru un C. Pe această bază, putem calcula frecvența de apariție în mesaj a fiecărui codon dat.

Pentru AAA, frecvența este (1/6)', sau aproximativ 0,4 % . Pentru AAC, ACA și CAA, frecvența este aceeași - adică (1/6) ^{2} (5/6), sau aproximativ 2,3 % pentru fiecare . Împreună , cei trei codoni 2A : 1C reprezintă 6,9% din toate secvențele de trei litere . În mod similar , fiecare dintre cei trei codoni 1A :2C reprezintă (1/6)(5/6), sau 11,6 % (sau un total de 34,8 %); CCC este reprezentat de (5/6) ^{3}, sau 57,9 % din codoni.

Examinând procentele diferiților aminoacizi încorporați în polipeptida sintetizată sub îndrumarea acestui mesaj, se pot propune compoziții probabile de baze pentru fiecare dintre acești aminoacizi (Figura 13.4). Deoarece prolina apare în 69 % din cazuri , s -ar putea propune că prolina este codificată de CCC (57,9 %) și de unul dintre codonii 2C :1A (11,6 %). Histidina , în proporție de 14 % , este probabil codificată de un codon 2C:1A (11,6%) și de un codon 1C:2A (2,3 %). Treonina , în proporție de 12%, este aproape sigur codificată doar de un codon 2C:1A. Asparagina și glutamina par a fi codificate de unul dintre codonii 1C:2A , iar lizina pare a fi codificată de AAA.

Multe experimente similare au fost efectuate , folosind chiar până la patru ribonucleotide diferite pentru a construi ARNm . Însă , *deși* determinarea compoziției cuvintelor cod triplete corespunzătoare celor 20 de aminoacizi prin această metodă a reprezentat un progres

Compoziții posibile	Posibili tripleți	Probabilitatea apariției oricărui triplet	procent final
3A	AAA	(1/6)' = 1/216 = 0,4%	0,4
1C:2A	AAC ACA CAA	(5/6)(1/6) ^{2} = 5/216 = 2,3%	3 x 2,3 = 6,9
2C:1A	ACC CAC CCA	(5/6) ^{2} (1/6) = 25/216 = 11,6%	3 x 11,6 = 34,8
3C	CCC	(5/6)' = 125/216 = 57,9%	57,9
			100,0

Sinteza chimică a mesajului

ARN -ul TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
CCCCCCCCCCCCCCCAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAA

Traducerea mesajului

Procentul de aminoacizi din proteină		Atribuirea compoziției probabile a bazelor
Lisi na	<1	AAA
Glutamină	2	1C:2A
Asparagină	2	1C:2A
Treonină	12	2C:1A
Histidină	14	2C:1A, 1C:2A
Prolină	69	CCC, 2C:1A

FIGURA 13.4 Rezultatele și interpretarea unui experiment de amestecare a copolimerilor utilizând un raport 1 A:5C (1/6A:5/6C).

secvențele specifice ale tripleților erau încă necunoscute - erau încă necesare alte tehnici .

Tehnica de îmbinare a tripleților

Nu după mult timp, au fost dezvoltate tehnici mai avansate. În 1964, Nirenberg și Philip Leder au dezvoltat testul de legare a tripleților, care a condus la atribuirea specifică a tripleților. Această tehnică a profitat de observația că ribozomii, atunci când sunt prezentați in *vitro* cu o secvență de ARN care conține cel puțin trei ribonucleotide, se leagă de aceasta și formează un complex similar cu cel găsit *in vivo.* Secvența tripletului de ARN acționează ca un codon în ARNm, atrăgând o moleculă de ARNt care conține o secvență complementară (Figura 13.5). Această secvență triplet din ARNt, care este complementară codonului ARNm, se numește - anticodon .

Deși nu era încă fezabilă sintetizarea chimică a lanțurilor lungi de ARN, secvențe specifice de triplete puteau fi sintetizate în laborator pentru a servi drept șabloane. Tot ce era nevoie era o metodă pentru a determina ce ARNt-aminoacid se va lega de complexul triplet ARN-ribozom. Sistemul de testare conceput de Nirenberg și Leder era destul de simplu. Aminoacidul care urma să fie testat era făcut radioactiv și combinat cu ARNt-ul corespunzător, creând un ARNt „încărcat". Deoarece compozițiile codonilor erau cunoscute (deși nu secvențele exacte), se putea lua o decizie cu privire la ce aminoacizi să fie testați pentru fiecare triplet specific.

ARNt-ul radioactiv, tripletul de ARN asociat ribozomilor și ribozomii sunt incubați împreună pe un filtru de nitroceluloză, care reține ribozomii (datorită dimensiunii lor mari), dar nu și celelalte componente mai mici, cum ar fi ARNt -ul încărcat. Dacă radioactivitatea nu este reținută pe filtru, a fost testat un aminoacid incorect. Dacă radioactivitatea este reținută pe filtru, acest lucru se datorează faptului că ARNt-ul încărcat s-a legat de tripletul de ARN asociat ribozomilor, care rămâne pe filtru. În acest caz, se poate efectua atribuirea specifică a codonilor.

I AHORA RESUELVA ESTO |

13.1 Într-un experiment de amestecare a copolimerilor folosind polinucleotide fosforilază, s-a utilizat un raport 3/4G:1/4C pentru a forma mesajul sintetic. Compoziția de aminoacizi a proteinei rezultate a fost determinată a fi:

Glicină	36/64	(56%)
Alanină	12/64	(19%)
Arginină	12/64	(19%)
Prolină	4/64	(6 procente)

Pe baza acestor informații:

(a) Indicați procentul (sau fracția) de apariție a fiecărui codon posibil în mesaj.

(b) Determinați o atribuire consistentă a compoziției de baze pentru aminoacizii prezenți.

(c) Luând în considerare ipoteza oscilației, preciți cât mai multe atribuiri specifice de codoni.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm un experiment de amestecare a copolimerilor și să prezicem atribuirea compoziției codonilor pentru aminoacizii codificați de mesajul sintetic. Cheia rezolvării este de a calcula mai întâi proporția fiecărui codon din ARN-ul sintetic și apoi de a potrivi aceste proporții cu proporțiile aminoacizilor sintetizați.*

Lucrarea a fost efectuată în mai multe laboratoare și, în multe cazuri, s-au obținut rezultate clare și lipsite de ambiguitate. De exemplu, Tabelul 13.2 prezintă 26 de tripleți atribuiți la zece aminoacizi diferiți. Cu toate acestea, în unele cazuri, tehnica de legare a tripleților a fost ineficientă și nu a fost posibilă efectuarea atribuirilor. În cele din urmă , au fost atribuite 50 din cele 64 de tripleți . Aceste atribuiri specifice ne-au permis să tragem două concluzii importante. În primul rând,

TABLA 13.2 atribuirea aminoacizilor la trinucleotide specifice, derivată din testul de legare a tripleților.

Trinudeotide	Aminoacizi
AAA AAG AUG	Lizină Metionină
AUU AUC AUA CCU CCC CCG CCA	Izoleucină Prolină
CUC CUA CUG CUU GAA GAG	Leucină Acid glutamic
UCU UCC UCA UCG	Serina
UGU UGC	Cisteină
UUA UUG UUU UUC	Leucină Fenilalanină

Codul genetic este degenerat; adică , mai mult de un codon poate specifica același aminoacid. În al doilea rând, codul *este, de asemenea, lipsit de ambiguitate;* adică , fiecare codon specifică un singur aminoacid. După cum vom vedea mai târziu în capitol și cu câteva excepții minore, aceste concluzii au fost confirmate ulterior. Tehnica de legare a tripleților a fost o inovație importantă în descifrarea codului genetic.

Copolimeri repetitivi

Pentru a descifra codul genetic, Gobind Khorana a dezvoltat o altă tehnică revoluționară la începutul anilor 1960. Khorana a reușit să sintetizeze chimic molecule lungi de ARN formate din secvențe scurte repetate de mai multe ori. Mai întâi, a creat secvențe individuale scurte (de exemplu, di-, tri- și tetranucleotide), pe care apoi le-a replicat de mai multe ori și în final le-a unit enzimatic - pentru a forma polinucleotide mai lungi. Așa cum este ilustrat în Figura 13.6, o dinucleotidă produsă în acest mod devine un ARNm cu doi codoni care...

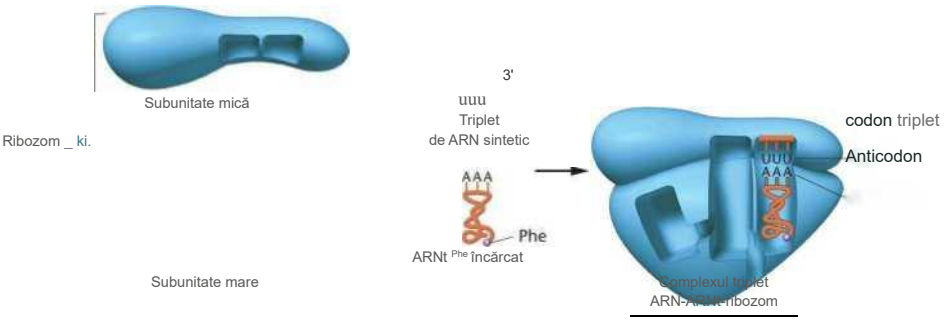


FIGURA 13.5 Comportamentul componentelor într-un test de legare a tripletului . Când tripletul UUU este poziționat pe ribozom, acesta acționează ca un

codon, atrăgând anticodonul complementar AAA al ^{ARNt} încărcat .

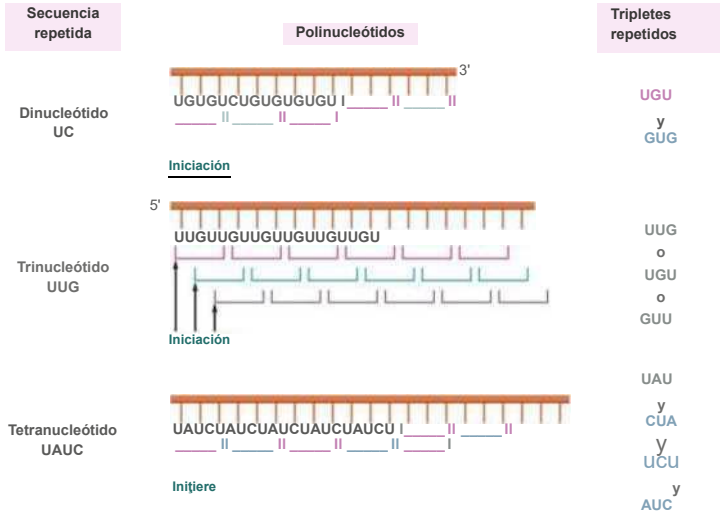


FIGURA 13.6 Conversia di-, tri- și tetranudeotidelor în copolimeri repetitivi. Sunt arătați codonii tripleți produși în fiecare caz .

Acestea se repetă. O trinucleotidă devine un ARNm care poate fi citit ca conținând unul dintre cele trei triplete repetitive potențiale, în funcție de punctul în care are loc inițierea. În cele din urmă, o tetranucleotidă produce patru secvențe de triplete repetitive .

Când aceste ARNm sintetice au fost adăugate la un sistem fără celule, s-a constatat că proporțiile prezise de aminoacizi au fost încorporate în polipeptidele rezultate . Când aceste date au fost combinate cu date din experimentele de amestecare a copolimerilor și legare a tripleților, s-au putut face atribuiri specifice .

Un exemplu al atribuirilor specifice efectuate în acest mod ilustrează importanța abordării lui Khorana. Luați în considerare următoarele experimente conexe : (1) *Secvența repetată de trinucleotide* UUCUU-CUUC... produce trei codoni posibili - UUC, UCU și CUU - în funcție de situsul de start. Atunci când este plasată într-un sistem de translație fără celule , aceasta produce trei homopolimeri polipeptidici, care conțin fie fenilalanină (phe), serină (ser), fie leucină (leu). Astfel, știm că fiecare dintre tripleți codifică unul dintre cei trei aminoacizi, deși nu știm exact ce aminoacid este codificat de fiecare triplet. (2) Pe de altă parte, *secvența repetată de dinucleotide* UCUCUCUC... produce tripleții UCU și CUC și, atunci când este utilizată într-un experiment, duce la încorporarea leucinei și serinei într- un polipeptid. Prin urmare , codonii UCU și CUC specifică leucina și serina, deși încă nu știm care dintre tripleți specifică fiecare aminoacid . Totuși , luând în considerare ambele rezultate împreună, putem concluziona că UCU, care este comun ambelor experimente, trebuie să codifice fie leucină , fie serină, dar nu și fenilalanină. Prin urmare, fie CUU , fie UUC codifică fie leucină , fie serină, în timp ce celălalt codifică fenilalanină . (*3*) Pentru a deduce informații *mai* specifice , putem examina rezultatele obținute folosind secvența repetată a tetranucleotidului UUAC , care produce codonii UUA, UAC, ACU și CUU. Codonul CUU este unul dintre cei doi care ne interesează . Acesta încorporează trei aminoacizi : leucină, treonină și tirozină . Deoarece CUU trebuie să specifice fie serina , fie leucina și deoarece doar leucina apare în polipeptida rezultată, putem concluziona că CUU specifică leucina. Odată ce această atribuire este stabilită , putem determina logic toate atribuirile specifice rămase . Dintre cele două perechi de triplete rămase (UUC și UCU din primul experiment și UCU și CUC din al doilea experiment), oricare triplet este comun ambelor trebuie să codifice serina . Astfel, UCU codifică serina. Prin eliminare, se stabilește că UUC codifică fenilalanina, iar CUC leucina. Prin urmare , în urma acestei analize logice laborioase , cu aceste experimente am reușit să atribuim trei aminoacizi diferiți la patru triplete specifice.

ACUM REZOLVĂ ASTA

13.2 Când se utilizează copolimeri repetați pentru a forma ARNm sintetic , dinucleotidele produc un singur tip de polipeptidă care conține doar doi aminoacizi, în timp ce tetranucleotidele produc trei polipeptide diferite. Pe de altă parte, utilizarea unor secvențe de trinucleotide diferite, fiecare compusă dintr- un singur tip de aminoacid, are ca rezultat o polipeptidă diferită. De ce? Ce se va întâmpla când se utilizează o tetranucleotidă?

■ SUGESTIE: *Această problemă ne cere să luăm în considerare diferitele - rezultate ale experimentelor cu copolimeri repetați. Cheia rezolvării acesteia este să fim conștienți de faptul că, atunci când se utilizează un copolimer ARN repetat, traducerea poate inița la diferite ribonucleotide. Trebuie doar să determinați numărul de codoni produși pe baza începutului la fiecare dintre diferitele ribonucleotide.*

Pe baza acestor interpretări, Khorana a reafirmat identitatea tripleților care fuseseră deja descifrați și a completat lacunele lăsate de alte abordări. Câteva exemple sunt prezentate în Tabelul 13.3 . De exemplu, utilizarea a două secvențe de tetranucleotide, GAUA și GUAA, a sugerat că cel puțin doi tripleți erau *codoni stop* . Khorana a ajuns la această concluzie deoarece niciuna dintre aceste secvențe repetate nu a direcționat încorporarea a mai mult de câțiva aminoacizi într-un polipeptid - prea puțini pentru a fi detectați. Nu există tripleți comuni ambelor mesaje și ambele păreau să conțină cel puțin un triplet care a cauzat terminarea sintezei proteinelor. Dintre posibilii tripleți din secvența poli-(GAUA), prezentată în Tabelul 13.3 , s-a dovedit ulterior că UAG este un codon stop .

13.4

TABLA 13.3 Aminoácidos incorporados utilizando copolímeros sintéticos repetidos de ARN

Copolimeri) repetido	Codones producidos	Aminoácidos en el polipéptido resultante
UG	UGU GUG	Cisteína Valina
AC	ACA CAC	Treonina Histidina
UUC	UUC UCU CUU	Fenilalanina Serina Leuci na
AUC	AUC UCA CAU	Isoleucina Serina Histidina
UAUC	UAU CUA UCU AUC	Tirosina Leucina Serina Isoleucina
GAUA	GAU AGA UAG AUA	Ninguno Ninguno Ninguno Ninguno

Dicționarul de coduri dezvăluie câteva modele interesante printre cei 64 de codoni

■

Diversele tehnici utilizate pentru descifrarea codului genetic au produs un dicționar cu 61 de codoni tripleți atribuiți aminoacizilor. Cei trei tripleți rămași sunt semnale stop și nu specifică niciun aminoacid.

Degenerarea *și* ipoteza oscilației

Examinarea dicționarului codului genetic relevă un model general de atribuire a codonilor . Figura 13.7 prezintă atribuirile conform unui model deosebit de ilustrativ sugerat de Francis Crick.

UAU tyr
Controlul unității de control al utilizatorilor (UAC)z
Oprire UAA
Oprire UAG

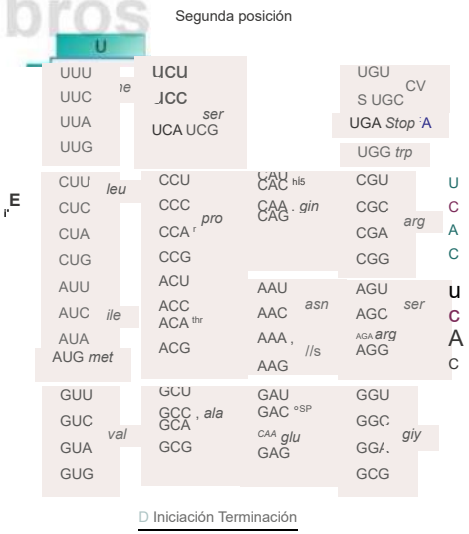


FIGURA 13.7 Diccionario del código genético. AUG codifica metionina, que inicia la mayoría de cadenas polipeptídicas. Todos los otros aminoácidos excepto el triptófano, que está codificado por UGG, están representados por dos a seis tripletes. Los tripletes UAA, UAG y UGA son señales de terminación y no codifican ningún aminoácido.

Cea mai evidentă constatare este că codul este degenerat, așa cum au prezis primii cercetători. Adică, marea majoritate a aminoacizilor sunt specificați de doi, trei sau patru codoni diferiți. Trei aminoacizi (serina, arginina *și* leucina) sunt codificați fiecare de șase codoni. Doar triptofanul și metionina sunt codificate de un singur codon.

De asemenea, este evident *modelul* de degenerare . Foarte des, seturile de codoni care specifică același aminoacid sunt grupate împreună, astfel încât primele două litere sunt identice și diferă doar în a treia. De exemplu, așa cum se vede în Figura 13.7, codonii pentru fenilalanină (UUU și UUC, în colțul din stânga sus al tabelului de coduri) diferă doar în a treia literă. Fie U, fie C în a treia poziție specifică fenilalanina. Există patru codoni care specifică valina (GUU, GUC, GUA și GUG, în colțul din stânga jos) și diferă, de asemenea, doar în a treia literă. În acest caz, toate cele patru litere din a treia poziție specifică valina.

Crick a observat acest model de degenerare în tot codul și, în 1966, a postulat **ipoteza oscilației.** Ipoteza lui Crick prezice că primele două ribonucleotide ale tripletului sunt mai importante decât al treilea membru pentru atragerea ARNt-ului corect. Crick a propus că legătura de hidrogen de la a treia poziție a interacțiunii codon -anticodon ar fi *mai puțin* restricționată spațial și nu ar trebui să respecte la fel de strict regulile stabilite de împerechere a bazelor. Ipoteza oscilației propune un set mai flexibil de reguli de împerechere a bazelor la a treia poziție a codonului (Tabelul 13.4).

Această cerință mai puțin stringentă pentru împerecherea bazelor, sau „oscilație", permite anticodonului unui singur tip de ARNt să se împerecheze cu mai mult de un triplet de ARNm. Conform ipotezei oscilației și degenerării codului, un U la prima poziție (capătul 5') a anticodonului ARNt se poate împerechea fie cu un A, fie cu un G la a treia poziție (capătul 3') a codonului ARNm, iar un G se poate împerechea fie cu un U, fie cu un C. Inozina (I), una dintre bazele modificate găsite în ARNt (descrisă în Capitolul 15), se poate împerechea cu C, U sau A. Aplicând aceste reguli de oscilație, sunt necesare aproximativ minimum 30 de tipuri diferite de ARNt pentru...

Yo Reguli de împerechere a bazelor anticodon-codon

Baza primei poziții (capătul 5') parte a ARNt	Baza celei de-a treia poziții (capătul 3') parte a ARNm
Un	U
C	G
G	Co U
U	AoG

TABLA 13.

A, UoC găzduiește cei 61 de codoni care specifică un aminoacid. Cel puțin, oscilația poate fi considerată o măsură economică, atâta timp cât fidelitatea traducerii nu este compromisă . Estimările actuale sunt că există între 30 și 40 de tipuri de ARNt în bacterii și până la 50 de tipuri de ARNt în celulele animale și vegetale.

Natura ordonată a codului

O altă observație privind modelul secvențial al codonilor și al aminoacizilor corespunzători a condus la descrierea a ceea ce se numește cod genetic ordonat. Aceasta înseamnă că *aminoacizii similari* din punct de vedere chimic au în comun una sau două baze „ intermediare" în diferitele triplete care îi codifică . De exemplu, un U sau un C este adesea prezent în a doua poziție a tripletelor care specifică aminoacizii hidrofobi , cum ar fi valina și alanina, printre alții . Există doi codoni care specifică lizina (AAA și AAG), un aminoacid încărcat pozitiv. Prin schimbarea doar a literei din mijloc a acestor codoni de la A la G (AGA și AGG), se specifică arginina , un alt aminoacid încărcat pozitiv . Aminoacizii hidrofili, cum ar fi serina sau treonina, sunt specificați prin codoni cu G sau C în a doua poziție.

Proprietățile chimice ale aminoacizilor vor fi discutate mai detaliat în Capitolul 14. Rezultatul final al unui cod „ordonat" este acela că acesta atenuează efectul potențial al mutațiilor asupra funcției proteinelor . În timp ce multe mutații în a doua bază a codonilor tripleți duc la substituția unui aminoacid cu altul, substituția este adesea cu un aminoacid cu proprietăți chimice similare . În aceste cazuri, funcția proteinei ar putea fi modificată imperceptibil .

Inițiere, terminare și ștergere

Spre deosebire de experimentele *in vitro* discutate mai sus , inițierea sintezei proteinelor *in vivo* Este un proces extrem de specific. La bacterii, aminoacidul inițial inserat în toate lanțurile polipeptidice este o formă modificată de metionină - N-formilmetionină (fMet). Un singur codon, AUG, codifică metionina și este uneori numit codon de inițiere . Cu toate acestea, atunci când AUG apare într -o moleculă de ARNm, mai degrabă decât la un situs de inițiere, metionina neformilată este inserată în lanțul polipeptidic. Rareori, un alt codon, GUG, specifică metionina în timpul inițierii, deși nu este clar de ce se întâmplă acest lucru, deoarece GUG codifică de obicei valină.

La bacterii, odată ce sinteza proteinelor este completă , gruparea formil este îndepărtată din metionina inițială sau reziduul de formilmetionină este eliminat complet. La eucariote, aminoacidul inițial în

sinteza polipeptidelor este metionina neformilată. Ca și în cazul bacteriilor, acest reziduu inițial de metionină poate fi îndepărtat din polipeptidă.

Așa cum s-a menționat în secțiunea anterioară, alți trei codoni (UAG, UAA și UGA) servesc drept codoni stop, care sunt semnale de punctuație ce nu codifică niciun aminoacid*. Aceștia nu sunt recunoscuți de nicio moleculă de ARNt și , atunci când sunt întâlniți, traducerea este terminată. Mutațiile care au ca rezultat oricare dintre acești trei codoni în cadrul unei gene provoacă, de asemenea, terminarea traducerii. În acest caz, se sintetizează doar un polipeptid parțial, deoarece este eliberat prematur din ribozom. Când apare una dintre aceste modificări în ADN, aceasta se numește mutație nonsens.

13,5

Codul genetic a fost confirmat în studiile asupra fagului MS2

Toate aspectele codului genetic discutate până acum oferă o imagine destul de completă. Codul este alcătuit din triplete, este degenerat, lipsit de ambiguitate și nu are virgule, deși conține semne de punctuație sub formă de semnale de început și de sfârșit. Aceste principii particulare au fost confirmate de analiza detaliată, efectuată de Walter Fiers și colaboratorii săi, a bacteriofagului MS2 care conține ARN.

MS2 este un bacteriofag care infectează *E. coli. Acidul* său - nucleic (ARN) conține aproximativ 3.500 de ribonucleotide și codifică doar trei gene. Aceste gene specifică învelișul proteic, o replică direcționată de ARN și o proteină de maturare (proteina A). Acest sistem simplu, format dintr-un genom mic și puține produse genetice, le-a permis lui Fiers și colaboratorilor săi să secvențieze gena și produsele acesteia. Secvența de aminoacizi a învelișului proteic a fost finalizată în 1970, iar secvența de nucleotide a genei și a unor nucleotide de la fiecare capăt a fost publicată în 1972.

Când natura chimică a unei gene este comparată cu cea a unei proteine, se observă o relație coliniară . Adică, secvența liniară de codoni formată de nucleotide corespunde exact secvenței liniare de aminoacizi din proteină. În plus, codonul pentru primul aminoacid este AUG, codonul de început comun ; iar codonul pentru ultimul aminoacid este urmat de doi codoni de stop consecutivi , UAA și UAG. Vom reveni asupra acestui concept în Capitolul 14.

În 1976, celelalte două gene MS2 și produsele lor proteice au fost secvențiate. Analiza a demonstrat clar că codul genetic din virusuri era identic cu cel găsit în sistemele bacteriene. Dovezi suplimentare sugerează că și codul este identic la eucariote , confirmând astfel ceea ce părea a fi un cod universal .

13.6

Codul genetic este aproape universal.

■

Între 1960 și 1978, s-a presupus pe scară largă că se va constata că codul genetic este universal, funcționând la fel la virusuri, bacterii, archaea și eucariote. Fără îndoială , natura ARNm și mecanismul de traducere păreau a fi foarte similare la aceste organisme. De exemplu, sistemele celulare derivate din bacterii ar putea traduce ARNm eucariot. Un poli-U stimulează sinteza polifenilalaninei în sistemele celulare atunci când componentele sunt derivate din eucariote. Multe studii recente care implică tehnologia ADN-ului recombinant (Capitolul 20) au arătat că genele eucariote pot fi inserate în celule bacteriene , transcrise și traduse . Printre eucariote, ARNm de șoarece și iepure a fost injectat în ouă de amfibieni , unde a fost tradus eficient . Pentru majoritatea genelor eucariote care au fost secvențiate, și în special pentru cele ale moleculelor de hemoglobină, secvența de aminoacizi a proteinelor codificate se potrivește cu dicționarul de codoni stabilit din studiile cu bacterii .

Totuși , în 1979, mai multe publicații despre proprietățile de codificare ale ADN-ului mitocondrial (ADNmt) de la drojdie și oameni au contestat ipoteza universalității limbajului genetic . De atunci, a fost examinat ADNmt de la multe alte organisme .

Fragmente clonate de ADNmt au fost secvențiate și comparate cu secvențele de aminoacizi ale diferitelor proteine mitocondriale , dezvăluind mai multe excepții de la dicționarul de coduri (Tabelul 13.5). Cel mai surprinzător a fost faptul că codonul UGA, care specifică în general terminarea, specifică inserția triptofanului în timpul traducerii în mitocondriile de drojdie și umane . În mitocondriile umane , AUA , care specifică în mod normal izoleucina , direcționează inserția internă a metioninei. În mitocondriile de drojdie , treonina este inserată în loc de leucină - atunci când CUA se găsește în ARNm .

În 1985, au fost descoperite și alte *câteva* excepții de la codul genetic standard la bacteria *Mycoplasma capricolum.* și în genele nucleare ale protozoarelor ciliate *Paramecium , Tetrahymenay Stylonychia.* De exemplu, așa cum se arată în Tabelul 13.5 , o modificare transformă codonul

TABLA 13.5 Excepții de la codul universal

Codon	Cuvântul cod normal	Cuvântul cod modificat	Sursă
UGA	Terminare	Trp	Mitocondriile umane și de drojdie; *Mycoplasma*
CUA	Leu	Trecerea	Mitocondriile de drojdie
AUA	El	Met	Mitocondriile umane
AGA	Arg	Terminare	Mitocondriile umane
AGG	Arg	Terminare	Mitocondriile umane
UAA	Terminare	Gin	*Paramecium, Tetrahymena și Stylonychia*
UAG	Terminare	Gin	*Parameciu*

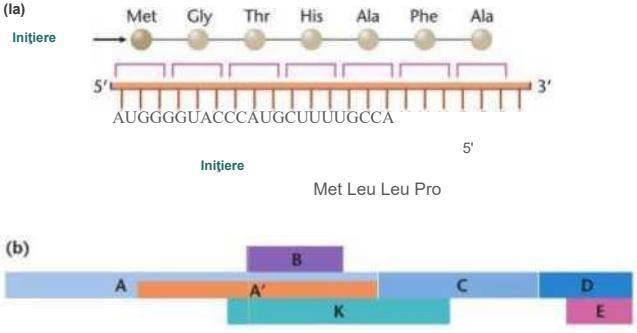
Codonul stop (UGA) este convertit în triptofan. Mai multe alte modificări transformă un codon stop în glutamină. Aceste modificări sunt importante deoarece au fost observate atât la organisme procariote, cât și la mai multe organisme eucariote; adică la diferite specii care au evoluat separat pe o perioadă lungă de timp.

Observați modelul aparent al mai multor atribuții de codon modificate: modificarea capacităților de codificare implică doar o modificare în recunoașterea celei de-a treia poziții, cea de oscilație. De exemplu, AUA specifică izoleucina în citoplasmă și metionina în mitocondrii, dar în citoplasmă, AUG specifică metionina. În mod similar, UGA declanșează terminarea în citoplasmă, dar încorporează triptofan în mitocondrii ; în citoplasmă , UGG specifică triptofan. S-a sugerat că aceste modificări în recunoașterea codonilor ar putea reprezenta o tendință evolutivă către o reducere a numărului de ARNt care sunt precise în mitocondrii; de exemplu , mitocondriile umane codifică doar 22 de ARNt. Cu toate acestea, până când nu se descoperă alte cazuri, aceste diferențe ar trebui considerate excepții de la regulile generale de codificare pe care le-am stabilit mai sus.

13.7 Puncte de inițiere diferite creează gene care se suprapun

Am stabilit anterior că codul genetic nu se suprapune, ceea ce înseamnă că fiecare ribonucleotidă din codul pentru *un anumit polipeptid* face parte dintr-un singur codon. Cu toate acestea, această caracteristică a codului nu exclude posibilitatea ca un singur ARNm să aibă mai multe situsuri de inițiere a translației. Dacă acesta ar fi cazul, aceste situsuri ar putea crea teoretic mai multe cadre de citire în cadrul aceluiași ARNm, specificând mai mult de un polipeptid. Figura 13.8 (a) ilustrează acest concept de gene suprapuse . Rețineți că folosim și acronimul ORF *(Open Reading Frame - Cadru de citire deschis)* pentru a ne referi la o genă. Un ORF este definit ca o secvență de ADN care produce o moleculă de ARN cu un codon de început și unul de sfârșit, între care se află o serie de codoni tripleți care specifică aminoacizii care alcătuiesc un polipeptid. Astfel, uneori vorbim și despre *ORF-uri suprapuse.*

Când fagul X174 a fost investigat amănunțit, s-a suspectat că acest lucru s-ar putea întâmpla de fapt la unele virusuri. Cromozomul său ADN circular este format din 5.386 de nucleotide, care ar trebui să codifice maximum 1.795 de aminoacizi - suficient pentru cinci sau șase proteine. Cu toate acestea, s-a observat că acest virus minuscul sintetizează nouă proteine formate din peste 2.300 de aminoacizi. O comparație între secvența de nucleotide a ADN-ului și secvențele de aminoacizi ale polipeptidelor



Genele sintetizate au clarificat acest paradox aparent. Au fost descoperite cel puțin patru cazuri de inițiere multiplă, formând gene suprapuse [Figura 13.8(b)].

Secvențele care specifică polipeptidele K și B încep în cadrul secvenței care specifică polipeptida A, dar într-un cadru de citire diferit. Secvența genei *K* se suprapune cu secvența adiacentă care specifică polipeptida C. Secvența E are un cadru de citire diferit de D, dar începe în interiorul acestuia. În cele din urmă, secvența A', cu același cadru de citire ca și secvența A, începe la mijlocul ultimei secvențe. Ambele se termină în același punct. În total, șapte polipeptide diferite sunt formate din secvența de ADN care altfel ar fi specificat doar trei (A, C și D).

O situație similară a fost observată și la alte virusuri și bacterii. Utilizarea cadrelor de citire suprapuse optimizează cantitatea limitată de ADN prezentă. Cu toate acestea, această tehnică de stocare a informațiilor are un dezavantaj caracteristic: o singură mutație poate afecta mai mult de o proteină, crescând astfel probabilitatea ca schimbarea să fie dăunătoare sau letală. În cazul pe care tocmai l-am prezentat [Figura 13.8(b)], o singură mutație la mijlocul genei B ar putea afecta potențial alte trei proteine (proteinele A, A' și K). Acesta ar putea fi motivul pentru care, deși sunt și ele prezente, genele suprapuse nu sunt norma la alte organisme.

Mai recent, analiza genomică a făcut posibilă examinarea unor informații extinse despre secvențele de ADN din organismele eucariote, dezvăluind că conceptul de gene suprapuse se aplică și acestor organisme, inclusiv mamiferelor. De exemplu, un studiu ADN efectuat pe oameni și șoareci a detectat peste 1.200 de astfel de cazuri. La oameni, au fost observate suprapuneri parțiale , precum și cazuri în care o genă este complet integrată în secvența unei alte gene, mai mari. În cazul a trei gene umane, *MUTYH, TOE1* și *TESK2, TOE1* conține regiuni codificatoare care se suprapun cu *MUTYH* la capătul 5' și cu TESK2 *la* capătul 3'.

13,8

Transcripția sintetizează ARN folosind un șablon de ADN

În timp ce se studia codul genetic, era destul de clar că proteinele erau produsul final al multor gene. Astfel, în timp ce unii geneticieni încercau să descifreze codul, alte cercetări s-au concentrat asupra naturii expresiei genelor. Întrebarea fundamentală era cum putea ADN-ul, un acid nucleic, să specifice o proteină compusă din aminoacizi.

Este un proces complex, în mai mulți pași, care începe cu transferul informațiilor genetice stocate în ADN către ARN. Procesul prin care moleculele de ARN sunt sintetizate folosind un șablon de ADN se numește transcripție. Rezultatul este o moleculă de ARNm complementară secvenței genetice a uneia dintre cele două catene ale dublei helixuri. La rândul său, fiecare codon de ARNm este complementar regiunii anticodon corespunzătoare a ARNt, care încorporează aminoacidul corect în lanțul polipeptidic în timpul traducerii. Importanța procesului de transcripție este enormă, deoarece reprezintă pasul inițial în *fluxul de informații* din interiorul celulei . Următoarele observații sugerează că ARN-ul participă ca moleculă intermediară la fluxul de informații dintre ADN și proteine:

1. ADN-ul este asociat în mare parte cu cromozomii din nucleul celulelor eucariote. Cu toate acestea, sinteza proteinelor are loc în asociere cu ribozomii situați în citoplasmă, în afara nucleului. Prin urmare, ADN-ul nu pare să participe direct la sinteza proteinelor.
2. ARN-ul este sintetizat în nucleul celulelor eucariote , unde se găsește ADN-ul, și este similar din punct de vedere chimic cu ADN-ul.
3. Odată sintetizată, cea mai mare parte a ARN-ului migrează în citoplasmă , unde are loc sinteza proteinelor (traducerea).
4. În mod normal, într-o celulă, cantitatea de ARN este proporțională cu cantitatea de proteină.

Luate împreună, aceste observații sugerează că informația genetică, stocată în ADN , este transferată către o moleculă intermediară de ARN care dirijează sinteza proteinelor . Ca majoritatea ideilor noi din genetica moleculară, primele dovezi experimentale care susțin existența unei molecule intermediare de ARN s-au bazat pe studii asupra bacteriilor și bacteriofagilor.

13.9

Studiile cu bacterii și fagi au furnizat dovezi ale existenței ARNm

În două articole publicate în 1956 și 1958, Elliot Volkin și colaboratorii săi au raportat analiza ARN-ului produs după infecția *E. coli* cu un bacteriofag. Folosind izotopul 32P pentru a urmări ARN-ul nou sintetizat, au stabilit că compoziția sa de baze semăna foarte mult cu cea a ADN-ului fagic, dar diferea de cea a ARN-ului bacterian (Tabelul 13.6). Acest ARN nou sintetizat

TABLA 13.6 Compoziția de bază (în procente molare) a ARN-ului produs imediat după infecția *E. coli* cu bacteriofagii T2 și T7, comparativ cu compoziția ARN a *E. coli* neinfectată

Fântână	Adenină	Timină	Urac i lo	Citozină	Guanină
ARN după infecția în celulele infectate cu T2	33 de ani	—	32	18 ani	18 ani
ADN T2	32	32	—	17*	18 ani
ARN după infecția în celulele infectate cu T7	27	—	28 de ani	24	22
ADN-ul T7	26	26	—	24	22
ARN-ul *E. coli*	23 de ani	—	22	18 ani	17 ani

•5-hidroximetil citozină.
Sursa: Volkin și Astrachan (1956); și Volkin, Astrachan și Countryman (1958).

ARN-ul sintetizat era instabil (de scurtă durată); cu toate acestea, s-a demonstrat că producerea sa a precedat sinteza de noi proteine fagice. Prin urmare, Volkin și colaboratorii săi au luat în considerare posibilitatea ca sinteza ARN-ului să fie o etapă preliminară în procesul de sinteză a proteinelor .

Deși se știa că ribozomii participă la sinteza proteinelor , rolul lor în acest proces era neclar . Așa cum am menționat anterior, o posibilitate era ca fiecare ribozom să fie specific proteinei sintetizate în asociere cu acesta. Adică, poate că informația genetică din ADN a fost transferată la ARN-ul (ARNr) al unui ribozom în timpul sintezei sale, astfel încât fiecare ribozom era limitat la producerea unei proteine specifice . Ipoteza alternativă era că ribozomii erau „bănci de lucru" nespecifice pentru sinteza proteinelor și că informația genetică specifică se afla în ARN-ul mesager .

Într-un experiment elegant care a utilizat sistemul fagic al *E. coli* , ale cărui rezultate au fost publicate în 1961, Sidney Brenner, Françoise Jacob și Matthew Meselson au clarificat această problemă. Ei au marcat ribozomii E. *coli* neinfectați cu izotopi grei și apoi au permis infecția cu fagi în prezența precursorilor - radioactivi de ARN . Prin urmărirea acestor componente în timpul translației, cercetătorii au demonstrat că sinteza proteinelor fagice (dirijată de ARN -ul nou sintetizat) a avut loc în ribozomii bacterieni deja prezenți înainte de infecție . Se pare că ribozomii nu erau - specifici, ceea ce a întărit ipoteza că un alt tip de ARN servește ca intermediar în procesul de sinteză a proteinelor .

În același an, Sol Spiegelman și colegii săi au ajuns la aceeași concluzie prin izolarea ARN-ului fagic marcat cu i2P după infecția bacteriană și utilizarea acestuia în experimente de hibridizare moleculară . Acești oameni de știință au încercat să hibridizeze acest ARN cu ADN-ul fagic și bacterian în experimente separate. ARN-ul a hibridizat doar cu ADN-ul fagic, demonstrând că secvența sa de baze era complementară informațiilor genetice ale virusului.

Rezultatele acestor experimente sunt în concordanță cu conceptul de ARN mesager (ARNm) produs pe o matriță de ADN, care apoi dirijează sinteza proteinelor specifice în asociere cu ribozomii. În 1961, Françoise Jacob și Jacques Monod au propus oficial acest concept ca parte a unui model de reglare genică la bacterii. De atunci, ARNm a fost izolat și studiat temeinic. Nu mai există nicio îndoială cu privire la rolul său în procesele genetice.

1 3.10

ARN polimeraza dirijează sinteza ARN-ului

Pentru a demonstra că ARN-ul poate fi sintetizat dintr -un mol de ADN, a fost necesar să se demonstreze că există o enzimă capabilă să dirijeze această sinteză. În 1959, mai mulți cercetători, inclusiv Samuel Weiss, au descoperit independent o astfel de moleculă în ficatul de șobolan. Numită ARN polimerază, aceasta are aceleași cerințe generale de substrat ca ADN polimeraza, cu excepția - importantă că nucleotidele pe care le folosește ca substrat conțin riboză în loc de dezoxiriboză. Spre deosebire de ADN polimerază, aceasta nu necesită un primer pentru a iniția sinteza . Reacția generală care rezumă sinteza ARN-ului dintr-un șablon de ADN poate fi exprimată astfel :

. *DN .
"(NTPJ^ÎNMPJ. + ^PP,)"

După cum arată ecuația , nucleozidele trifosfate (NTP) servesc drept substraturi pentru enzimă, care catalizează polimerizarea nucleozidelor monofosfate (NMP), sau nucleotidelor , în lanțuri polinucleotidice (NMP)n. În timpul sintezei, nucleotidele sunt legate prin legături fosfodiesterice 5'-3' (vezi Figura 10.12). Energia creată prin scindarea precursorului trifosfat în forma monofosfat declanșează reacția, iar fosfații anorganici (PPi) sunt produși.

O a doua ecuație rezumă adăugarea secvențială a fiecărui ribonucleotid pe măsură ce procesul de transcripție progresează :

ADN
(NMP), + NTP— ;(NMP)„ +1 + PP,

După cum arată această ecuație , fiecare etapă a transcripției - implică adăugarea unei ribonucleotide (NMP) la lanțul poliribonucleotidic (NMP) rtH în creștere , utilizând un nucleozid trifosfat (NTP)

ca precursor.

ARN polimeraza E. *coli* a fost caracterizată exhaustiv și s-a demonstrat că este compusă din subunități desemnate ca *α, p, p', α>* și β_r. Forma complexă, activă a enzimei, holoenzima, conține subunitățile *α, PP' și cr* și are o greutate moleculară de aproape 500.000 de daltoni. Deși există unele variații în compoziția subunităților altor bacterii, polipeptidele *P și P' sunt* cele care furnizează baza catalitică și situsul activ pentru transcripție. După cum vom vedea, factorul β _r (sigma) [Figura 13.9(a)] joacă un rol de reglare în inițierea transcripției ARN-ului .

Deși *E. coli* are un singur tip din această enzimă, aceasta posedă mai mulți factori *cr distincti* , ceea ce duce la variația holoenzimei polimerazei. Eucariotele, pe de altă parte, au trei forme distincte de ARN polimerază, fiecare compusă dintr-un număr mai mare de subunități polipeptidice decât forma bacteriană a enzimei. În această secțiune, vom discuta procesul de transcripție la organismele procariote. Mai târziu în acest capitol, vom reveni la procesul de transcripție la eucariote.

ACUM REZOLVĂ ASTA |

13.3 Următoarele secvențe de dezoxiribonucleotide provin dintr-o catenă matriță de ADN:

5 ' -CTTTTTTGCC AT-3 '
5-ACATCAATAACT-3'
5-TACAAGGGTTCT-3'

(a) Pentru fiecare catenă, determinați secvența de ARNm produsă prin transcripție .
Secuencia 1 :
Secuencia 2:
Secuencia 3:

(b) Folosind Figura 13.7, determinați secvența de aminoacizi codificată în aceste ARNm.

(c) Pentru secvența 1, care este secvența catenei complementare de ADN ?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să luăm în considerare rezultatul transferului de informații complementare de la ADN la ARN, precum și să determinăm aminoacizii codificați de această informație . Cheia rezolvării acesteia este să ne amintim că, în ARN, uracilul este complementar adeninei și că , în timp ce ADN-ul stochează informații genetice în celulă, mesajul tradus este conținut în ARN-ul complementar catenei matriță a ADN-ului care formează o genă.*

www.medilibros.com

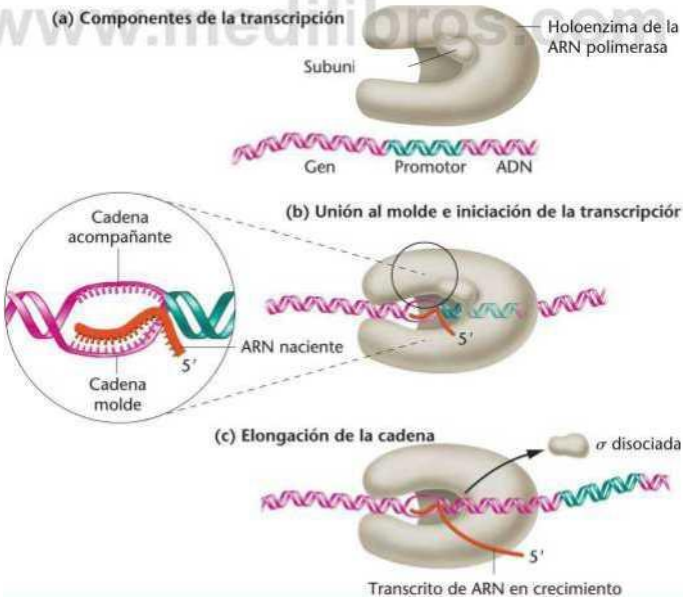


FIGURA 13.9 Primeras etapas de la transcripción en procariontes, que incluyen: (a) los componentes del proceso; (b) la unión al molde en el sitio — 10 que implica a la subunidad sigma de la ARN polimerasa y la iniciación posterior de la síntesis de ARN; y (c) la elongación de la cadena, después de que la subunidad *cr* se haya disociado del complejo de transcripción y la enzima se mueva a lo largo del molde de ADN.

Promotorii, uniunea cu matrița și subunitatea cr

Transcripția are ca rezultat sinteza unei molecule de ARN monocatenar, complementară unei regiuni a uneia dintre cele două catene ale ADN-ului cu dublă helix. Când discutăm despre transcripție, ne putem referi la *catena* de ADN transcrisă ca la catena matriță, iar *la catena sa complementară* ca la catena însoțitoare.

Pasul inițial în transcripția genelor procariote este cunoscut sub numele de legarea catenei șablon [Figura 13.9(b)]. La bacterii, situsul pentru această legare inițială este stabilit atunci când subunitatea cr a ARN polimerazei recunoaște secvențe specifice de ADN numite promotori . Aceste secvențe sunt situate în regiunea 5', în amonte de situsul de început al transcripției unei gene. Se crede că enzima „scanează" o bucată de ADN până când găsește o regiune promotor și se leagă de aproximativ 60 de perechi de nucleotide ale helixului, dintre care 40 sunt în amonte de situsul de început al transcripției. Odată ce acest lucru s-a întâmplat, helixul este denaturat local sau derulat, făcând catena șablon de ADN accesibilă enzimei . Punctul în care începe de fapt transcripția se numește situs de început al transcripției.

Nu exagerăm atunci când subliniem importanța secvențelor promotorilor, deoarece interacțiunea promotorilor cu ARN polimeraza reglează eficiența transcripției prin reglarea inițierii acesteia. Natura legăturii promotor -polimerază este unul dintre principalele subiecte de discuție privind reglarea genetică și îi vom dedica capitolele 16 și 17. Deși aceste capitole prezintă informații mai detaliate privind interacțiunile promotor-enzimă , există trei puncte pe care ar trebui să le evidențiem aici.

Mai întâi, vom aborda conceptul de secvențe consens de ADN , secvențe similare (omoloage) în gene diferite ale aceluiași organism sau în una sau mai multe gene ale unor organisme înrudite. Conservarea lor de-a lungul evoluției confirmă natura critică a funcției lor în procesele biologice. Două secvențe consens au fost găsite în promotorii bacterieni. Una, TATAAT, este situată la 10 nucleotide în amonte de situsul de început al transcripției (regiunea -10 sau cutia Pribnow). Cealaltă, TTGACA, este situată la 35 de nucleotide în amonte (regiunea -35) . Mutațiile din oricare dintre aceste regiuni afectează transcripția, adesea sever.

Secvențele de acest gen din regiunile adiacente genei în sine se numesc elemente cu acțiune cis . Utilizarea termenului *cis* provine din nomenclatura chimiei organice și înseamnă „aproape" sau „de aceeași parte cu" alte grupări funcționale, spre deosebire de *trans sau „* de cealaltă parte ". Prin urmare , în genetica moleculară , elementele cis Aceștia sunt cei care se află pe aceeași moleculă de ADN . În schimb, factorii *transactivi* sunt molecule care se leagă de aceste elemente de ADN .

Al doilea aspect este că gradul de legare a ARN polimerazei la diferiți promotori variază enorm, ceea ce duce la variații în expresia genelor. Acest lucru este atribuit în prezent variațiilor secvențelor promotorilor . La bacterii , au fost descoperiți atât promotori puternici, cât și slabi , ceea ce duce la variații ale timpului de inițiere, care poate varia de la o dată la 1 sau 2 secunde până la o dată la 10 sau 20 de minute. Mutațiile în secvențele promotorilor pot reduce semnificativ inițierea expresiei genelor.

Un ultim punct general se referă la subunitatea <r din bacterii. Tipul principal este desemnat <r70 · datorită greutății sale moleculare de 70 kilodaltoni (kDa). Promotorii majorității genelor bacteriene recunosc această formă ; cu toate acestea, există mai multe forme alternative de ARN polimerază în *E. coli.* Acestea au subunități <r cu caracteristici asociate (de exemplu , <r , , $<^{rs}$ și $<r^{£}$).

Fiecare dintre forme recunoaște secvențe promotoare diferite , care la rândul lor oferă specificitate procesului de inițiere a transcripției .

Inițierea, elongarea și terminarea sintezei ARN-ului

Odată ce ARN polimeraza a recunoscut și s-a legat de promotor, ADN-ul trece de la forma sa bicatenară la o structură deschisă , expunând catena șablon. Enzima inițiază apoi sinteza ARN-ului prin inserarea primului ribonucleozid trifosfat 5' la situsul de pornire , care este complementar primului nucleotid . Așa cum s - a menționat anterior , nu este necesar niciun primer . Pe măsură ce polimerizarea ARN-ului continuă , ribonucleotidele complementare ulterioare sunt inserate și legate între ele prin legături fosfodiesterice . Acest proces are loc în direcția 5'-3' (față de ARN-ul nascent) , creând un duplex ADN / ARN temporar cu 8 perechi de baze, cu catene antiparalele [Figura 13.9(b)].

După ce aceste ribonucleotide s-au unit lanțului de ARN în creștere, subunitatea <r se disociază de holoenzimă, iar alungirea lanțului continuă sub direcția nucleului enzimatic [Figura 13.9 (c)]. La *E. coli,* Acest proces se desfășoară la o viteză aproximativă de 50 nucleotide /secundă la 37 °C.

Enzima scanează întreaga genă până când întâlnește în final o secvență de nucleotide specifică care acționează ca semnal de terminare . Aceste

secvențe de terminare, lungi de aproximativ 40 de perechi de baze , sunt extrem de importante la procariote datorită proximității dintre capătul unei gene și secvențele din amonte ale genei adiacente. Un aspect interesant al terminării la bacterii este acela că secvența de terminare menționată anterior este transcrisă în ARN. Secvența de nucleotide caracteristică din această regiune de terminare determină ca transcriptul nou format să se plieze înapoi pe sine, formând ceea ce se numește o structură secundară în ac de păr, care este ținută împreună prin legături de hidrogen. Acest ac de păr este important pentru terminare. În unele cazuri, terminarea sintezei depinde și de factorul de terminare rho (p). Rho este o proteină hexamerică mare care interacționează fizic cu transcriptul ARN în creștere, facilitând terminarea transcripțională .

Când are loc terminarea, molecula de ARN transcrisă este eliberată din matrița de ADN, iar nucleul enzimei polimerazei se disociază. Molecula de ARN sintetizată este exact complementară secvenței de ADN a catenei matriță a genei. Oriunde există un reziduu A, T, C sau G, reziduul corespunzător U, A, G sau C este încorporat în molecula de ARN. În cele din urmă, aceste molecule de ARN furnizează informațiile care duc la sinteza tuturor proteinelor prezente în celulă.

Este important de menționat că, adesea la bacterii, grupurile de gene ale căror produse sunt implicate în aceeași cale metabolică sunt grupate pe cromozom. În multe cazuri, genele sunt contigue și toate, cu excepția ultimei, nu au semnalul care codifică terminarea transcripției . Rezultatul este că în timpul transcripției se produce o moleculă lungă de ARNm, care codifică mai mult de o proteină. Deoarece genele bacteriofage sunt uneori numite *grupuri* de complementare și *cistroni (vezi* Capitolul 6), acest ARN se numește ARNm policistronic. Produsele genelor transcrise în acest mod reprezintă de obicei toate nevoile celulei la un moment dat , deci aceasta este o modalitate eficientă de a transcrie și apoi de a traduce informațiile genetice necesare. La eucariote , ARNm-urile monocistronice sunt regula, deși se descoperă din ce în ce mai multe excepții.

13.11 Transcripția la eucariote diferă de transcripția procariotelor în mai multe moduri

O mare parte din cunoștințele noastre despre transcripție provin din studiile efectuate pe procariote. Majoritatea aspectelor generale ale mecanicii acestor procese sunt similare la eucariote, dar există câteva diferențe importante:

1. La eucariote , transcripția are loc în nucleu și este dirijată de trei tipuri diferite de ARN polimerază. Spre deosebire de procesul procariot, la eucariote , transcriptul ARN nu se poate asocia cu ribozomii înainte ca transcripția să fie completă. Pentru a fi tradus, ARNm trebuie să părăsească nucleul și să intre în citoplasmă.
2. Inițierea transcripției genelor eucariote necesită ca fibra compactă de cromatină, caracterizată prin înfășurarea nucleozomilor , să se desfacă, făcând ADN-ul accesibil ARN polimerazei și altor proteine reglatoare. Această tranziție, numită *remodelare a cromatinei,* reflectă dinamica schimbării conformaționale care are loc atunci când helixul ADN-ului se desface (Capitolul 12).
3. Inițierea și reglarea transcripției implică o interacțiune extinsă între secvențele de ADN cu acțiune *cis și* factorii proteici cu acțiune *trans , care* sunt implicați în stimularea și inițierea transcripției . ARN polimerazele eucariote , de exemplu, depind *de factorii de transcripție (TF)* pentru a analiza și lega ADN-ul. Pe lângă promotori, există și alte unități de control, numite *amplificatoare* și *amortizoare,* care pot fi localizate în regiunea de reglare 5' în amonte de situsul de inițiere, deși au fost găsite și în interiorul genei sau chiar în regiunea 3' în aval , dincolo de secvența codificatoare.
4. Alterarea transcriptului ARNm primar pentru a genera ARNm eucariot matur implică multe etape complexe, denumite în general „procesare". O etapă inițială de procesare implică adăugarea unui capăt 5' și a unei cozi 3' la majoritatea transcriptelor destinate să devină ARNm . Transcriptele inițiale (sau primare) sunt, de regulă, mult mai lungi decât cele care sunt în cele din urmă traduse în proteine. Astfel de transcripte , uneori numite pre-ARNm, se găsesc doar în nucleu și sunt denumite colectiv ARN nuclear eterogen (ARNhn). Doar aproximativ 25 % din moleculele de ARNhn sunt convertite în ARNm. În cele care sunt convertite, o cantitate substanțială din secvența de ribonucleotide este scindată, iar segmentele rămase sunt reunite înainte de a fi exportate din nucleu pentru traducere . Acest fenomen a dat naștere conceptelor de *gene fragmentate* și *splicing* la eucariote (așa cum se explică în Secțiunea 13.12).

În restul acestui capitol, vom analiza detaliile de bază ale transcripției în celulele eucariote. Procesul de transcripție este puternic reglementat, determinând ce secvențe de ADN sunt copiate în ARN, când sunt copiate și cât de frecvent sunt transcrise. În Capitolul 17, vom discuta subiecte direct legate de reglarea transcripției la eucariote.

Inițierea transcripției la eucariote

ARN polimeraza eucariotă există în trei forme distincte . Deși toate cele trei forme ale enzimei au în comun anumite subunități polipeptidice, fiecare transcrie diferite tipuri de gene, așa cum se arată în Tabelul 13.7. Toate trei sunt mai mari și mai complexe decât polimeraza procariotă unică. La drojdie, de exemplu, holoenzima este formată din două subunități mari și 10 subunități mai mici.

Tabelul 13.7 1 ARN polimeraze în eucariote

Tip	Produs	Locație
1	ARNr	Nucleol
II.	ARNm, ARNm scurt	Nucleoplasmă
al III-lea	ARNr 5S, ARNt	Nucleoplasmă

În ceea ce privește legarea inițială a șablonului și regiunile promotorului , știm aproape tot ce este necesar despre ARN polimeraza II (RNP II), care este responsabilă pentru transcripția unei game largi de gene la eucariote. Activitatea RNP II depinde atât de elementele cis-active care înconjoară gena în sine, cât și de o serie de factori de transcripție *trans- activi care* se leagă de aceste elemente de ADN (vom reveni la subiectul transcripției mai târziu). Există cel puțin patru elemente de ADN *cis -active* care reglează inițierea transcripției RNP II . Primul dintre aceste elemente, promotorul bazic, determină unde RNP II se leagă de ADN și unde începe să copieze ADN-ul în ARN. Celelalte trei tipuri de secvențe de ADN reglatoare, numite elemente promotor proximale, amplificatoare și amortizoare, influențează eficiența sau rata de inițiere a transcripției de către RNP II din elementul promotor bazic. Rețineți că la procariote, secvența de ADN recunoscută de ARN polimerază se numește și promotor. La eucariote, însă, inițierea transcripției este controlată de un număr mare de elemente de ADN cis-active .

elementul promotor bazic care acționează în poziție *cis* este așa-numita cutie Goldberg-Hogness sau cutie TATA. Situate la aproximativ 30 de perechi de nucleotide în amonte (-30) de situsul de inițiere a transcripției , cutiile TATA au în comun o secvență consens TATA $^{A}/_{T}$AAR, unde R reprezintă orice nucleotid purinic . Secvența și funcția cutiilor TATA sunt analoage cu cele găsite în regiunea promotorului -10 a genelor procariote . Cu toate acestea , reamintim că în organismele procariote, ARN polimeraza se leagă direct de regiunea promotorului la poziția -10. După cum vom vedea mai târziu, acest lucru nu este valabil și la eucariote . O gamă largă de promotori bazici și proximali sunt, de asemenea, localizați în regiunile de reglare ale genelor eucariote, iar fiecare dintre aceste elemente poate afecta eficiența inițierii transcripției de la situsul de inițiere . Multe dintre aceste elemente vor fi analizate mai detaliat în Capitolul 17.

Deși elementele promotoare eucariote pot determina locul și eficiența generală a inițierii, alte elemente cunoscute sub numele de amplificatori și amortizoare au efecte mult mai semnificative asupra transcripției genelor eucariote. Așa cum sugerează și numele lor , amplificatorii cresc nivelurile de transcripție , în timp ce amortizoarele le scad . Locațiile acestor elemente pot varia, de la a fi imediat în amonte de un promotor până la a fi localizate în aval, în cadrul unei gene sau la câteva kilobaze distanță. Astfel, ele pot modula transcripția la distanță. amplificatorii și amortizoarele acționează adesea prin creșterea sau scăderea transcripției ca răspuns la cerințele unei celule pentru un produs genetic , într- un anumit stadiu de dezvoltare sau într- o anumită locație din cadrul organismului. Fiecare genă eucariotă are propriul set distinctiv de elemente proximale de promotor, amplificator și amortizoare.

secvențele de reglare care acționează în cis Există mai mulți factori transactivi care facilitează legarea RNP II și, prin urmare , inițierea transcripției . Aceste proteine sunt numite factori *de* transcripție . Există două categorii generale de factori de transcripție: factori generali de transcripție (GTF), care sunt absolut necesari pentru transcripția mediată de RNP II , și activatori și represori transcripționali, care influențează eficiența sau rata de inițiere a transcripției de către RNP II. Factorii generali de transcripție sunt esențiali deoarece RNP II nu se poate lega direct de situsurile corespunzătoare ale promotorilor eucarioți de bază sau nu poate inița transcripția fără prezența lor . Factorii generali de transcripție implicați în legarea RNP II la om sunt bine caracterizați și sunt desemnați TFIIA , TFIIB etc. Unul dintre aceștia, TFIID, se leagă direct de secvența TATA box . Odată ce a avut loc legarea inițială a TFIID și ADN-ului , ceilalți

factori generali de transcripție, împreună cu RNP II, se leagă secvențial de TFIID, formând un complex mare de pre -inițiere .

Factorii de transcripție specifici (activatorii și represorii menționați anterior) se leagă de elementele amplificatoare și de amortizoare și reglează inițierea transcripției , fie promovând, fie - inhibând asamblarea complexelor de pre-inițiere. Se pare că aceștia înlocuiesc rolul factorului *a* pe care le-am văzut în enzima procariotă și care sunt de mare importanță pentru reglarea genelor eucariote. În capitolul 17 vom analiza rolul factorilor de transcripție generali și specifici în reglarea genelor eucariote , precum și elementele de ADN care se leagă de acești factori.

Descoperiri recente despre funcția ARN polimerazei

interes să aflăm mai multe despre ARN polimeraza în organismele eucariote datorită sarcinii dificile cu care se confruntă în timpul transcripției de-a lungul fibrei de cromatină . Enzima trebuie să se confrunte cu substratul de ADN, care, spre deosebire de bacterii, este înfășurat în jurul proteinelor histone organizate în nucleozomi. Reamintim că aceste structuri au compactat ADN-ul bicatenar, ceea ce reprezintă un obstacol în calea transcripției (Capitolul 12). Prin urmare, enzima trebuie să deschidă molecula și să separe (să denatureze) cele două catene, astfel încât catena șablon să poată trece prin situsul său activ în timpul sintezei ARN. Capacitatea de a cristaliza structuri mari de acid nucleic-proteină și de a efectua analize de difracție cu raze X la o rezoluție sub -5 Å a adus lumină asupra acestei probleme; în special, munca lui Roger Kornberg și a colegilor, utilizând enzima izolată din drojdie, a fost deosebit de informativă. Este util de menționat că o rezoluție mai mică de 2,8 Å permite vizualizarea fiecărui aminoacid al fiecărei proteine din complex.

Descoperirea lui Kornberg oferă o explicație extrem de detaliată a celor mai critice procese ale transcripției. La drojdie , RNP II conține două subunități mari și 10 subunități mai mici, formând un complex tridimensional enorm, cu o greutate moleculară de aproximativ 500 kDa. Regiunea promotorului duplexului ADN care urmează să fie transcris se potrivește într-un șanț încărcat pozitiv, format între cele două subunități mari ale enzimei. Ansamblul subunităților seamănă cu o pereche de fălci care se pot deschide și închide parțial. Înainte de legarea la ADN, șanțul este deschis; odată legat, șanțul se închide parțial , fixând duplexul în timpul inițierii transcripției . Regiunea critică a enzimei implicată în această tranziție are o dimensiune de aproximativ 50 kDa și se numește - clemă .

Odată fixate de clemă, segmentele unei mici regiuni duplex de ADN se separă într-o poziție din cadrul enzimei numită situs activ, inițiind sinteza ARN - ului *complementar* conform *segmentului șablon* de ADN . Cu toate acestea , întregul complex este instabil , iar transcripția se termină de obicei după încorporarea a doar câteva ribonucleotide . Deși motivul pentru aceasta este necunoscut , acest proces, numit transcripție avortată , Acest proces se repetă de mai multe ori înainte de a se forma un hibrid ADN:ARN stabil , ceea ce include formarea unui transcript de 11 ribonucleotide . Când se întâmplă acest lucru , transcripția eșuată este depășită , se formează un complex stabil și urmează imediat alungirea transcriptului pro - ARN . În acest moment, se spune că transcripția a atins un nivel extrem de progresiv de polimerizare a ARN-ului .

Pe măsură ce transcripția continuă, enzima se deplasează de-a lungul ADN-ului și, în orice moment, aproximativ 40 de perechi de baze de ADN și 18 reziduuri ale catenei de ARN în creștere fac parte din complexul enzimatic . ARN - ul nou sintetizat se deplasează printr - un șanț din enzimă și iese pe sub o structură numită capac , situată în partea superioară din spate . A fost identificată o altă zonă , *numită* por . la baza enzimei . Este punctul de intrare în complexul precursor al ARN - ului .

În timp , pe măsură ce transcripția continuă , enzima întâlnește porțiunea de ADN care semnalează terminarea , iar complexul devine din nou instabil, la fel ca în starea inițială a transcripției eșuate. Clema se deschide , iar atât ADN-ul , cât și ARN-ul sunt eliberate din enzimă , completând transcripția . Aceasta completează ciclul de transcripție . În concluzie , un complex instabil se formează în timpul inițierii transcripției ; stabilitatea este atinsă odată ce elongarea creează un duplex de dimensiuni suficiente ; elongarea continuă apoi ; și , în final , instabilitatea caracterizează din nou terminarea transcripției .

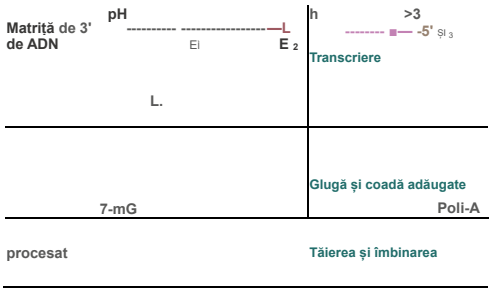
Evident, descoperirile lui Kornberg ne -au sporit considerabil - cunoștințele despre transcripție. Pentru această lucrare, i s-a acordat Premiul Nobel pentru Chimie în 2006. Pe baza descrierii de mai sus, încercați să vizualizați mental procesul de transcripție din momentul în care ADN -ul se leagă de enzimă până când transcriptul este eliberat din complexul molecular mare . Dacă vă puteți imagina clar acest proces, ați dobândit , fără îndoială

, o înțelegere solidă a transcripției la eucariote , care este mai complexă decât la procariote .

ARN nuclear eterogen și procesarea acestuia: capace și cozi

În timp ce la bacterii secvența de baze a ADN-ului este transcrisă în ARNm, care este tradus imediat și direct într-o secvență de aminoacizi conform codului genetic, transcrierile ARN-ului eucariot necesită modificări semnificative înainte de a fi transportate în citoplasmă și traduse. Până în 1970, dovezile acumulate au arătat că ARNm-ul eucariot este inițial transcris ca o moleculă precursoare mult mai lungă decât cea tradusă în proteină. Această noțiune s-a bazat pe observația lui James Darnell și a colegilor săi asupra ARN-ului nuclear eterogen (ARNhn) din nucleele mamiferelor care conțineau secvențe de nucleotide comune moleculelor de ARNm mai mici găsite în citoplasmă. Aceștia au propus că transcrierea inițială a unei gene era o moleculă lungă de ARN care trebuia mai întâi procesată în nucleu înainte de a apărea în citoplasmă ca o moleculă de ARNm matură. Diferitele etape de procesare, discutate mai jos, sunt rezumate în Figura 13.10.

modificare post-transcripțională importantă a transcrierilor de ARN eucariote destinate să devină ARNm are loc la capătul 5' al acestor molecule , unde se adaugă o capsulă de 7-metilguanozină (7-mG) . Capacul, care se adaugă chiar înainte de sintetizarea ARNm, este o componentă cheie a moleculei de ARNm.



Ei E 2 EJ

FIGURA 13.10 Procesarea post-transcripțională a ARN-ului la eucariote. Transcripția produce un pre-ARNm care conține o secvență lider (L), mai mulți introni (I) și mai mulți exoni (E), identificați pe catena șablon de ADN. Aceasta este procesată prin adăugarea unui capac 5',7-mG și a unei cozi 3'-poli-A. Intronii sunt apoi scindați, iar exonii sunt uniți pentru a crea ARNm matur. Deși aceste etape sunt prezentate secvențial în figură, în unele transcrieri eucariote, scindarea și splicing-ul au loc la introni înainte ca transcripția să fie completă și să fie adăugată coada poli-A, ceea ce duce la conceptul de *scindare și splicing co-transcripțional.*

care completează sinteza transcriptului inițial , pare a fi important pentru procesarea ulterioară în nucleu . De asemenea, protejează capătul 5' al moleculei de atacul nucleazelor . Ulterior, acest capac poate fi implicat în transportul ARNm matur prin membrana nucleară în citoplasmă și în inițierea translației ARNm în proteină.

Capacul este destul de complex și este caracterizat printr-o legătură specială 5'-5' între capac și ribonucleotida inițială a ARN-ului. Unele eucariote conțin, de asemenea, o grupare metil (CH3) pe atomul de carbon 2' al zahărului riboză al primelor două ribonucleotide ale ARN - ului .

Descoperirea faptului că atât pre-ARN-urile, cât și ARNm-urile conțin un fragment la capătul 3' de până la 250 de reziduuri de acid adenilic a furnizat date suplimentare despre procesarea transcrierilor de ARN în timpul maturării ARNm-ului . Această secvență poli -A este adăugată după ce capătul 3 ' al transcrierii inițiale este scindat enzimatic într- o poziție situată la aproximativ 10 până la 35 de ribonucleotide dintr -o secvență AAUAAA extrem de conservată . Această secvență poli-A a fost găsită la capătul 3' al aproape tuturor ARNm-urilor studiate la diverse organisme eucariote . De fapt, cozile poli-A au fost detectate și în unele ARNm-uri procariote. Excepțiile la eucariote par a fi ARN-urile care codifică proteinele histone.

Deși secvența AAUAAA nu se găsește în toate transcrierile eucariote , se pare că este esențială pentru cele care o posedă. Dacă o mutație modifică această secvență, transcrierile nu pot adăuga coada poli-A. În absența acestei cozi, transcrierile ARN sunt degradate rapid . Prin urmare, atât capacul 5' , cât și coada poli-A 3' sunt esențiale pentru transportul transcrierii ARNm în citoplasmă și traducerea acesteia.

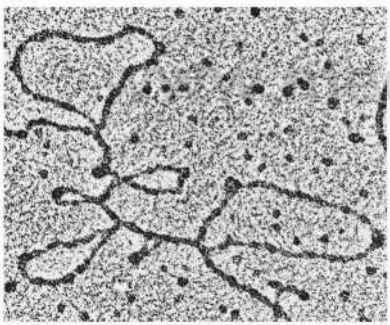
1 3.12

Regiunile codificatoare ale genelor eucariote sunt întrerupte de secvențe intercalate

Una dintre cele mai interesante descoperiri din istoria geneticii moleculare a avut loc în 1977, când Susan Berget, Philip Sharp și Richard Roberts au prezentat dovezi directe că genele virusurilor animale conțineau secvențe nucleotidice *interne* care nu erau exprimate în secvența de aminoacizi a proteinei pe care o codificau . Aceste secvențe interne de ADN se găsesc în transcriptul inițial de ARN, dar sunt eliminate înainte ca ARNm matur să fie tradus (Figura 13.10). Astfel de

segmente de nucleotide se numesc **secvențe intercalate,** iar genele care le conțin se numesc **gene fragmentate.** Aceste secvențe de ADN care nu sunt reprezentate în produsul final de ARNm se numesc și **introni** („int" de la intercalat), iar cele care sunt conservate și exprimate se numesc **exoni** („ex" de la exprimat). Splicing-ul implică eliminarea secvențelor de ribonucleotide prezente în introni ca urmare a unui proces de excizie, urmată de unirea exonilor.

Descoperiri similare au fost făcute curând în multe alte gene eucariote. Două abordări s-au dovedit a fi cele mai fructuoase. Prima implică hibridizarea moleculară a ARNm purificat, matur funcțional, cu ADN care conține genele din care **ARN -ul a fost transcris** inițial . Atunci când are loc hibridizarea între acizi nucleici **care nu sunt exact complementari,** se produc **heteroduplexuri** , în care intronii, prezenți în ADN , dar absenți din ARNm, formează bucle și **rămân** nepereche. Așa cum se arată în Figura 13.11, aceste structuri pot fi vizualizate cu un microscop.



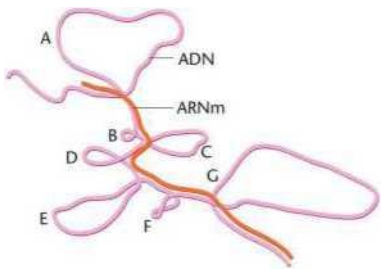


FIGURA 13.11 Micrografie electronică și desen interpretativ al unei molecule hibride (un heteroduplex) formată între catena AON matriță a genei ovalbuminei de pui și ARNm matur al ovalbuminei. Cei șapte introni din AON, AG, produc bucle nepereche.

electronic. Complexul de ovalbumină de pui prezentat în figură este un heteroduplex care conține șapte bucle (AG), care reprezintă șapte introni ale căror secvențe sunt prezente în ADN, dar nu și în ARNm -ul final.

informații mai specifice . Aceasta implică o comparație directă a secvențelor nucleotidice ale ADN-ului cu cele ale ARNm-ului și corelarea acestora cu secvențele de aminoacizi. Această abordare permite identificarea precisă a secvențelor intercalate.

Până în prezent, s-a demonstrat că majoritatea genelor eucariote conțin introni (Figura 13.12) . Una dintre primele gene identificate a fost **gena β3-globinei** de șoarece și iepure , studiată independent de Philip Leder și Richard Flavell. Gena șoarecelui are un intron de 550 de nucleotide, care începe imediat după codonul care specifică aminoacidul 104. La iepure , există un intron de 580 de perechi de baze lângă codonul pentru aminoacidul 110. În plus, ambele gene au un intron precedent de aproximativ 120 de nucleotide. Introni similari au fost găsiți în gena β3-globinei la toate mamiferele examinate .

Gena **ovalbuminei** la pui a fost caracterizată **pe larg** de Bert O'Malley în Statele Unite și de Pierre Chambon în Franța. După cum se arată în Figura 13.12, gena conține șapte introni. De fapt, cea mai mare parte a secvenței de ADN a genelor este „silențioasă", fiind compusă din introni. Transcriptul inițial de ARN este de aproape trei ori mai lung decât ARNm matur. Comparați informațiile despre gena ovalbuminei prezentate în Figurile 13.11 și 13.12 . Puteți potrivi buclele nepereche din Figura 13.11 cu secvența de intron specificată în Figura 13.12?

Lista genelor care conțin aceste tipuri de secvențe interne este foarte lungă. De fapt, puține gene eucariote par să fie **lipsite** de introni . Un exemplu extrem al numărului de introni dintr- o singură genă se găsește în gena

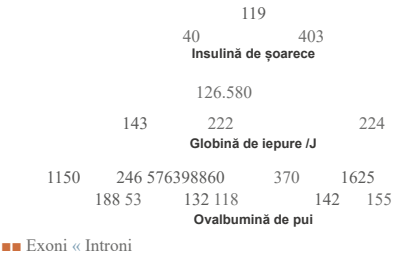


FIGURA 13.12 Secvențe intercalate în diverse gene eucariote . Numerele indică numărul de nucleotide din diferitele regiuni intronice și exonice.

Gena colagenului pro-α-2(α), care codifică una dintre subunitățile colagenului, principala proteină a țesutului conjunctiv la vertebrate, conține 50 de introni. Precizia cu care are loc splicing-ul trebuie să fie extraordinară pentru a evita introducerea de erori în ARNm matur. De asemenea, este demnă de remarcat comparația dintre dimensiunea genei și dimensiunea ARNm-ului final, după ce intronii au fost îndepărtați. După cum se arată în Tabelul 13.8, doar 15% din gena colagenului constă din exoni care vor apărea în cele din urmă în ARNm. Alte proteine prezintă comparații și mai extreme. Doar 8% din gena albuminei rămâne de tradus, iar în cea mai mare genă umană cunoscută, distrofina (al cărei produs proteic este absent în distrofia musculară Duchenne), doar 1% din secvența genetică rămâne în ARNm. Alte două gene umane sunt comparate în Tabelul 13.8.

Compararea dimensiunii genelor umane cu cea a ARNm-ului lor și numărul de introni pe care îi conțin

Gene ral	Dimensiunea genei (kb)	Dimensiunea numărului de introni ARNm (kb)	
Insulină	1.7	0,4	2
Colagen *[pro-a-2(1)]*	38,0	5.0	50
Albumină	25,0	2.1	14
Fenilalanină hidroxilază	90,0	2.4	12
Distrofină	2.000,0	17.0	50

Deși marea majoritate a genelor eucariote examinate până în prezent conțin introni, există câteva excepții. În special, genele care codifică histonele și interferonul par să nu conțină introni. Nu este clar de ce sau cum genele care codifică aceste molecule au rămas neschimbate de-a lungul evoluției, fără a dobândi informația străină caracteristică practic tuturor celorlalte gene.

Mecanismele de splicing: ARN-uri autocatalitice

Descoperirea genelor fragmentate a condus la cercetări intense pentru elucidarea mecanismelor prin care intronii ARN sunt tăiați și exonii sunt îmbinați . S - au înregistrat progrese semnificative, utilizând *studii in vitro extinse.* Interesant este că se pare că există mecanisme diferite pentru diferite tipuri de ARN și pentru ARN-urile produse în mitocondrii și cloroplaste.

Putem vizualiza cel mai simplu mecanism posibil pentru îndepărtarea intronilor , așa cum se arată în Figura 13.10 . După efectuarea unei „tăieri" endonucleolitice la fiecare capăt al unui intron, intronul este îndepărtat , iar capetele terminale ale exonilor adiacenți sunt ligate de o enzimă (pe scurt, un intron este îndepărtat, iar capetele exonilor sunt reunite) . Se pare că acest lucru se întâmplă cu intronii din ARN-ul de transfer (ARNt) la bacterii. O endonuclează specifică recunoaște capetele intronilor și taie secvența dintre ele. Apoi, ARN ligaza sigilează capetele exonilor pentru a finaliza fiecare etapă de tăiere . Cu toate acestea , în studiile tuturor celorlalte ARN-uri - ARNt la organismele eucariote - superioare și ARNr și pre-ARNm la toate eucariotele - tăierea precisă a intronilor este mult mai complexă și mult mai interesantă.

Intronii din organismele eucariote pot fi clasificați în mai multe grupuri pe baza mecanismelor lor de clivaj corespunzătoare. În Grupa I, reprezentată de introni care fac parte din transcrierile primare ale ARNr, nu sunt necesare componente suplimentare pentru clivajul intronului; intronul în sine este sursa activității enzimatice necesare pentru propria sa îndepărtare. Această descoperire surprinzătoare a fost făcută în 1982 de Thomas Cech și colaboratorii săi în timp ce studiau protozoarul ciliat *Tetrahymena.* ARN-urile capabile de activitate catalitică se numesc ribozime. Procesul de autoclivaj pentru intronii din Grupa I ilustrează acest proces și este prezentat în Figura 13.13. Din punct de vedere chimic, au loc două reacții nucleofile - adică reacții cauzate de prezența compușilor chimici bogați în electroni (în acest caz, reacții de transesterificare) . Prima este o interacțiune între o guanozină, care acționează ca un cofactor în reacție, și transcrierea primară [Figura 13.13(a)]. Gruparea 3'-OH a guanozinei este transferată la nucleotida adiacentă capătului 5' al intronului [Figurile 13.13(b) și 13.13(c)]. A doua reacție implică interacțiunea grupării 3'-OH nou dobândite la stânga exonului și a fosfatului de la capătul 3' al intronului [Figura 13.13 (c)]. Intronul este scindat și îndepărtat , iar cei doi exoni sunt îmbinați , rezultând ARN matur [Figura 13.13(d)].

Se știe acum că auto-clivajul intronilor din grupa I, așa cum este descris aici , are loc și în pre-ARNr al altor protozoare în afară de Tetrahymena . Auto-clivajul pare să controleze, de asemenea, eliminarea intronilor prezenți în transcrierile primare de ARNm și ARNt produse în mitocondrii și cloroplaste . Acești introni sunt numiți introni din grupa II. Ca și în cazul moleculelor din grupa I , scindarea implică două reacții autocatalitice care duc la excizia intronilor . Cu toate acestea, guanozina nu acționează ca un cofactor cu intronii din grupa II .

Mecanisme de tăiere: spliceosomul

Intronii sunt una dintre principalele componente ale transcrierilor pre-ARNm la eucariote. Comparativ cu intronii grupei I și grupei II ai

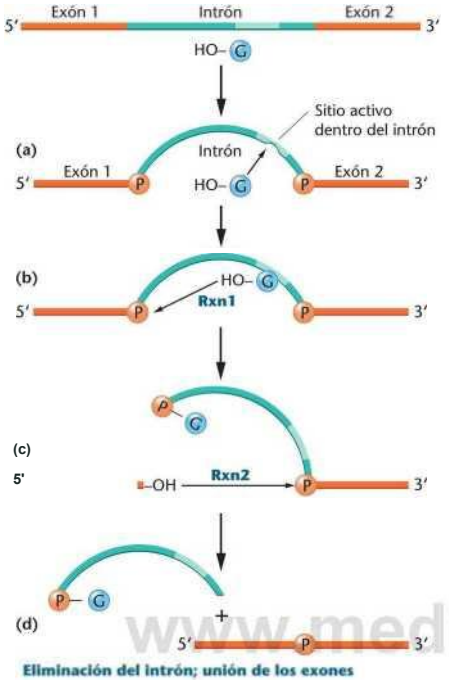


FIGURA 13.13 Mecanismo de corte y empalme para la eliminación de los intrones del grupo I del transcrito primario del ARNr inicial (pre-ARNr). El proceso es una autoescisión que implica dos reacciones de transesterificación.

Después cum am discutat, moleculele de ARNm nuclear pot fi mult mai mari - până la 20.000 de nucleotide - și sunt mai abundente. Îndepărtarea lor pare să necesite mecanisme mult mai complexe. Cu toate acestea, acum știm destul de multe despre procesul corespunzător.

Interesant este că reacțiile de clivaj sunt mediate de un complex molecular imens numit spliceozom, care a fost identificat atât în extractele de drojdie , cât și în celulele mamiferelor. Această structură este foarte mare, măsurând 40S la drojdie și 60S la mamifere - aceeași dimensiune ca și subunitățile ribozomale ! O componentă esențială a spliceozomilor este un grup particular de ARN-uri nucleare mici (snARN). Aceste ARN-uri au de obicei o lungime de 100 până la 200 de nucleotide sau mai puțin și formează complexe cu proteine pentru a crea ribonucleoproteine *nucleare mici* (snRNP sau snurps). Deoarece sunt bogate în reziduuri de uridină, snARN-urile sunt desemnate arbitrar ca U1, U2, ..., U6.

Figura 13.14 prezintă un model care ilustrează etapele de îndepărtare a intronului. Rețineți că, deși această figură prezintă componente separate, procesul este realizat de spliceosomul mare care înconjoară ARN-ul care este tăiat. Secvențele nucleotidice adiacente

---------- Intron ----------

Punct de ramificare [1] CAPETELE intronului încep la capătul 5' cu o secvență dinucleotidică GU, numită *secvență donor,* și se termină la capătul 3' cu o secvență dinucleotidică AG , numită *secvență acceptor. Aceste* secvențe

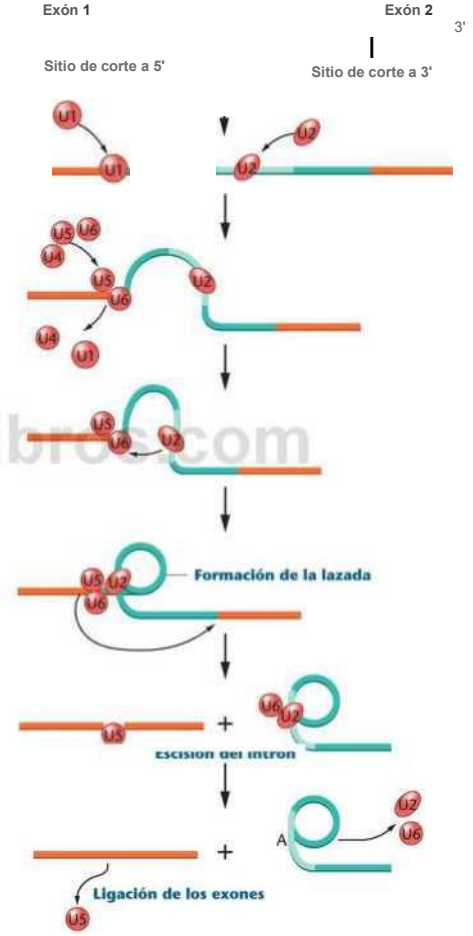


FIGURA 13.14 Modelo del mecanismo de corte y empalme para la eliminación de un intrón del pre-ARNm de origen nuclear. La escisión depende de diversos ARNsn (U1, U2,..., U6) que se combinan con proteínas para formar snRNP (snurps), que forman parte de la gran estructura conocida como espliceosoma. La estructura de lazada del estadio intermedio es característica de este mecanismo.

, precum și alte secvențe consens partajate de introni , atrag ARN-uri mici (snRNP) specifice spliceozomilor. De exemplu, ARN-ul mic U1 are o secvență nucleotidică complementară cu cea a capătului donor 5' al intronului. Împerecherea bazelor rezultată din această omologie promovează legarea care reprezintă primul pas în formarea spliceozomilor. După adăugarea celorlalte snRNP-uri (U2, U4, U5 și U6), începe scindarea. Ca și în scindarea intronilor din grupa I, sunt implicate două *reacții de transesterificare* . Prima implică gruparea 3'-OH a unui reziduu de adenină (A) prezentă într-o regiune a intronului numită punct de ramificare. Reziduul A se leagă de situsul 5' și scindează lanțul de ARN . Într-o etapă ulterioară, care implică mai multe alte snRNP-uri, se formează o structură intermediară, iar a doua reacție are loc, unind capătul 5' al intronului cu A. Aceasta formează o structură caracteristică de tip „buclă" numită *lariat,* care conține intronul scindat. Exonii sunt apoi uniți, iar snRNP-urile sunt eliberate.

Procesarea care are loc în timpul splicingului , care are loc în nucleu, reprezintă o potențială etapă de reglare în exprimarea genelor la organismele eucariote. De exemplu, sunt cunoscute mai multe cazuri în care intronii prezenți în pre-ARNm *derivați din aceeași genă sunt splicinați în mai multe moduri diferite, producând astfel seturi diferite de exoni* în ARNm matur. Acest proces, cunoscut sub numele de splicing alternativ , produce un grup de ARNm care, după traducere , au ca rezultat o serie de proteine înrudite numite izoforme. Multe exemple au fost găsite la - organisme, de la virusuri la *Drosophila* și oameni. Splicingul alternativ al pre-ARNm oferă baza pentru producerea de proteine înrudite dintr -o singură genă, crescând numărul de produse genetice care pot fi fabricate din genomul unui organism. Vom reveni la acest subiect în Capitolul 17, când vom discuta despre reglarea expresiei genelor la eucariote.

1 3.13

Editarea ARN-ului poate modifica transcrierea finală

La sfârșitul anilor 1980, un alt tip de procesare post-transcripțională a ARN-ului a fost descoperit la mai multe organisme. În această formă de procesare, numită editare a ARN-ului, secvența de nucleotide a pre-ARNm se modifică de fapt înainte de traducere . Drept urmare, secvența de ribonucleotide a ARN-ului matur diferă de secvența codificată în exonii ADN-ului din care a fost transcris ARN-ul.

Deși există și alte variații, cele două tipuri principale de editare a ARN-ului sunt editarea prin substituție, în care identitățile nucleotidelor specifice sunt modificate , și editarea prin inserție/ștergere, în care nucleotidele sunt adăugate sau eliminate din numărul total de baze. Editarea prin substituție este utilizată în unele ARN-uri eucariote care își au originea în nucleu și este foarte frecventă în ARN-ul transcris în mitocondriile și cloroplastele plantelor. *Physarum polycephalum,* o mucegai, folosește atât - editarea prin substituție, cât și cea prin inserție/ștergere pentru ARN-urile sale mitocondriale.

Tripanosomul, un parazit care cauzează boala somnului african, și alți paraziți înrudiți, utilizează editarea extinsă prin inserție/ștergere a ARN-urilor mitocondriale. Numărul de uridine adăugate la o anumită transcriere poate depăși 60% din secvența codificatoare, formând de obicei codonul de început și poziționând restul secvenței în cadrul de citire corect. ARN-ul ghid (ARNg) direcționează editarea prin inserție/ștergere în tripanosomi și este transcris din genomul mitocondrial în sine. Aceste ARN-uri mici au un grad ridicat de complementaritate cu regiunea editată a ARNm-urilor finale. Ele efectuează împerecherea bazelor cu ARNm-urile pre-editate pentru a direcționa mecanismul de editare, asigurându-se că sunt efectuate modificările corecte.

Cele mai bine studiate exemple de editare prin substituție apar în transcrierile de ARNm codificate de genomul nuclear la mamifere. Un exemplu este apolipoproteina *B (apo B),* care are o formă lungă și una scurtă codificate de aceeași genă. În celulele intestinale umane, ARNm-ul apo B este editat printr-o singură - schimbare C - U , care convertește un codon CAA al glutaminei într-un codon UAA de terminare a translației și termină polipeptida la aproximativ jumătate din lungimea sa codificată genomic. Editarea este efectuată de un complex proteic care se leagă de o secvență de andocare a transcrierii de ARNm chiar în aval de situsul de editare . Un al doilea exemplu îl reprezintă subunitățile care formează *canalele receptorului glutamatergic (GluR).* în țesutul cerebral al mamiferelor. În acest caz, adenozina (A) este editată în inozină (I) în pre-ARNm înainte de traducere, timp în care I este citit ca guanozină (G). Se crede că o familie de trei enzime ADAR (adenozin ARN deaminază) este responsabilă de editarea în diferite situsuri de pe subunitățile canalului de glutamat. ARN-urile dublu catenare necesare

pentru editare de către enzimele ADAR sunt furnizate prin împerecherea intron-exon a transcrierilor ARNm GluR. Modificările de editare modifică parametrii fiziologici (permeabilitatea solutului și timpul de răspuns la desensibilizare) ai receptorilor care conțin subunitățile.

Importanța editării ARN-ului ca urmare a activității enzimei ADAR devine mai evidentă atunci când se examinează situațiile în care aceste enzime și-au pierdut funcționalitatea din cauza unei mutații. Mai multe studii au demonstrat că această pierdere a funcției este letală la șoareci. Într-un studiu, embrionii heterozigoți pentru gena *ADAR1 defectă* au murit în timpul dezvoltării embrionare din cauza unor defecte ale sistemului hematopoietic. Într-un alt studiu, șoarecii cu două copii defecte ale *ADAR2* s-au dezvoltat normal, dar au fost predispuși la crize epileptice și au murit în timpul întârcării. Țesuturile lor conțineau versiunea needitată a unuia dintre produsele GluR. Se credea că defectul care a dus la moartea lor este localizat în creier. Persoanele heterozigote pentru mutație erau normale.

Descoperiri de acest gen la mamifere au dovedit că editarea ARN-ului oferă un alt mecanism important pentru modificarea post-transcripțională și că acest proces nu se limitează la genomurile mici sau care se reproduc asexuat, cum ar fi cel al mitocondriilor. De la descoperirea sa, în fiecare an au fost descoperite noi exemple de editare a ARN-ului, iar această tendință este foarte probabil să continue. În plus, aceste descoperiri au implicații importante pentru reglarea expresiei genelor.

13.14 Transcriptul a fost vizualizat folosind microscopia electronică

Vom încheia acest capitol prezentând o demonstrație vizuală remarcabilă a procesului de transcripție , bazată pe studii de microscopie electronică realizate de Oscar Miller Jr., Barbara Hamkalo și Charles Thomas. Munca lor combinată a surprins procesul de transcripție atât la procariote , cât și la eucariote. Figura 13.15 prezintă o micrografie și o serie de desene interpretative ale transcripției la *E. coli.* Micrografia prezintă multiple catene de ARN care emană din diferite puncte de-a lungul șablonului central de ADN . Multe catene de ARN sunt produse deoarece numeroase evenimente de transcripție au loc simultan la fiecare genă. Catenele de ARN progresiv mai lungi se găsesc în aval, mai departe de locul de început al transcripției , în timp ce catenele mai scurte sunt mai aproape de locul de început.

Studiul micrografiei lui *E. Colt* oferă o imagine interesantă. Deoarece procariotele nu au nucleu , ribozomii citoplasmatici nu sunt separați fizic de cromozom. Prin urmare, ribozomii se pot lega de molecule de ARNm *parțial transcrise* și pot iniția translația. Cu cât lanțurile de ARN sunt mai lungi , cu atât mai mulți ribozomi se atașează de ele. După cum vom vedea în Capitolul 14, aceste structuri se numesc poliribozomi. Vizualizarea transcripției - confirmă multe dintre predicțiile pe care oamenii de știință le-au făcut din analiza biochimică a acestui proces.

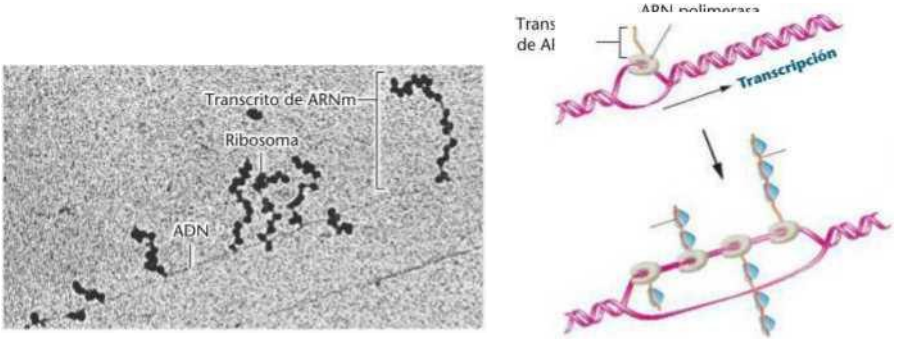


FIGURA 13.15 Micrografie electronică și desene interpretative ale transcripției simultane a genelor la *E. coli.* Pe măsură ce se formează fiecare transcript, ribozomii se leagă, inițiind traducerea simultană de-a lungul lanțului . *OL Miller, Jr., Barbara A. Hamkalo, CA Thomas, Jr.* Science 169:392-395, 1970 al *Asociației Americane pentru Avansarea Științei. F:2.*

GENÉTICA, ''E(

Reducerea la tăcere a genelor pe bază de acid nucleic: atacarea mesagerului

Chimioterapiile standard - utilizate pentru tratarea bolilor precum cancerul și SIDA au efecte secundare toxice. Medicamentele terapeutice convenționale afectează atât celulele normale , cât și pe cele bolnave ; celulele bolnave sau infectate sunt doar puțin mai sensibile decât celulele normale ale pacientului. Oamenii de știință și -au dorit de mult timp o soluție magică care să poată vâna și distruge virusurile sau celulele bolnave , lăsând în același timp celulele normale în viață și sănătoase. În ultimul deceniu, a apărut un grup deosebit de promițător de candidați la soluții magice , cunoscuți colectiv sub numele de medicamente *de reducere a tăcerii genetice pe bază de acid nucleic* .

Două terapii principale pe bază de acid nucleic investigate în prezent sunt *oligonucleotidele antisens* (ASO) și *interferență ARN* (*ARNi).* Ambele au apărut din înțelegerea biologiei moleculare a expresiei genelor. În primul rând, catena matriță a moleculei de ADN duplex este copiată într-un ARN mesager monocatenar (ARNm). În al doilea rând, ARNm se asociază cu ribozomii, iar informația sa codificată este tradusă în secvența de aminoacizi a unui polipeptid .

În mod normal, o genă este transcrisă în ARN dintr -o singură catenă a duplexului de ADN . ARN-ul rezultat este cunoscut sub numele de *ARN* sens . *Cu toate acestea* , uneori , cealaltă catenă de ADN poate fi copiată în ARN , iar acest ARN produs prin transcripția catenei „greșite" se numește *ARN antisens* . Când ambele sunt prezente împreună, catenele de ARN sens și antisens pot forma structuri duplex dublu catenare, iar formarea lor poate afecta ARN -ul sens în mai multe moduri.

În tehnologiile oligonucleotidelor antisens (ASO) , oamenii de știință proiectează oligonucleotide ADN antisens monocatenare (cu o lungime de aproximativ 20 de nucleotide) cu o secvență cunoscută și apoi sintetizează cantități mari din aceste nucleotide antisens *in vitro.* Teoretic, este posibil să se trateze celulele cu aceste oligonucleotide antisens sintetice , astfel încât acestea să pătrundă în celule și să se lege de ARNm țintă specifice cu o precizie ridicată. Legarea ADN - ului antisens la ARNm sens poate bloca fizic traducerea acestuia. Alternativ, poate avea loc degradarea ARN-ului . În ambele cazuri, expresia genelor este blocată .

Tehnica antisens este foarte interesantă datorită specificității sale potențiale . Deoarece un ASO are o secvență care se leagă specific de un anumit ARN sens , ar trebui să fie posibilă inhibarea sintezei proteinei specifice codificate de acel ARN sens. Dacă proteina este necesară pentru replicarea virală sau creșterea celulelor canceroase (dar nu este necesară în celulele normale) , oligonucleotidele antisens ar trebui să aibă doar efecte terapeutice.

medicament ASO , care vizează infecția cu citomegalovirus, este deja pe piață . Altele, concepute pentru a trata cancerele, boala Crohn , HIV -1 și hepatita C, se află în studii clinice de faza II .

A doua tehnică de reducere la tăcere a genelor, numită tehnologie ARNi (pe care o vom discuta mai detaliat în Capitolul 17), utilizează molecule scurte de ARN dublu catenar (cu o lungime de aproximativ 20 până la 25 de nucleotide) cu secvențe - complementare anumitor ARNm specifice celulelor . Aceste molecule sunt cunoscute sub numele de ARN-uri mici interferente *(siARN)* . Aceste molecule de ARNsi pot fi sintetizate *in vitro sau* Acestea pot fi transcrise într- o celulă din vectori clonați care sunt introduși în celule.

Odată ajuns în citoplasma celulară , ARNsi se asociază cu un complex enzimatic numit complex de silențiere indus de ARN (RISC *).* care se află în citoplasma celulei . O catenă de siARN este scindată în cadrul RISC , iar cealaltă catenă se leagă de un ARNm țintă care conține secvența de ARN complementară . Când RISC și siARN se leagă de ARNm țintă , RISC poate fie scinda ARNm țintă, fie interfera cu traducerea acestuia.

Studiile clinice ale ARNi sunt în curs de desfășurare pentru a studia utilizarea sa în combaterea degenerescenței maculare legate de vârstă , cu rezultate promițătoare. Alte domenii de mare interes pentru tratamentele bazate pe ARNi includ cancerele, bolile sistemului nervos și bolile virale , cum ar fi hepatita B și HIV-1.

Rândul tău

Acordați-vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a discuta unele dintre problemele legate de dezvoltarea și utilizarea terapiilor antisens.

Care sunt unele dintre provocările utilizării terapiilor bazate pe ASO? Prezintă siRNA aceleași provocări?

O discuție destul de echilibrată despre medicamentele bazate pe oligonucleotide antisens este prezentată în : Lebedeva, I. și Stein, CA 2001. Oligonucleotide antisens:

T

1.

Promisiuni și realități. *Annu. Rev. Pharmacol.* 41:403-419. Medicamentele ARNi sunt criticate în Dykxhoom, DM și Lieberman, J. 2006. Interferență curentă: perspective și obstacole în utilizarea ARN-urilor mici interferente ca medicamente cu molecule mici. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 8:377-402.

2. Au fost deja lansate pe piață medicamente terapeutice bazate pe ARNi? Ce studii clinice pentru medicamente ARNi sunt în desfășurare în prezent?

Puteți găsi informații despre studiile clinice la http://www.ClinicalTrials.gov . *Mai multe companii de biotehnologie , inclusiv Sirna Therapeutics, Alnylam Pharmaceuticals și Opko Health, dezvoltă terapii bazate pe ARNi. Site-urile lor web conțin, de asemenea, informații despre procesele de dezvoltare a medicamentelor bazate pe ARNi și studiile clinice.*

3. Studiile efectuate pe organisme model arată că ARNi este eficient în reducerea la tăcere a genelor implicate într-o gamă largă de infecții și boli. Care credeți că este cea mai promițătoare utilizare a ARNi în domeniul terapeutic?

Pentru informații despre studiile pe animale care utilizează reducerea la tăcere a genelor siRNA, consultați Dykx - Hoorn, DM și colab. 2006. Tratamentul silențios: siRNA-urile ca medicamente cu molecule mici . *Terapie genică* 13:541-552.

SAU

STUDIU DE CAZ | Un medicament care uneori funcționează

femeie în vârstă de 30 de ani cu β3-talasemie, o tulburare genetică recesivă cauzată de absența lanțului β3 al hemoglobinei , primea transfuzii de sânge de la vârsta de șapte ani. Cu toate acestea, în ciuda *transfuziilor* , sănătatea ei se deteriora. Ca tratament alternativ, medicul i - a administrat 5-azacitidină pentru a induce transcripția lanțului β3 . hemoglobină fetală pentru a înlocui lanțul γ lipsă . Acest medicament activează transcripția genelor prin eliminarea grupărilor metil din ADN. Adăugarea de grupări metil reduce la tăcere genele. Cu toate acestea , medicul își exprimă îngrijorarea deoarece aproximativ 40% din toate genele umane sunt în mod normal reduse la tăcere prin metilare. Cu toate acestea, după câteva săptămâni de tratament cu 5-azacitidină, starea pacientei se îmbunătățește semnificativ. Deși tratamentul a avut succes, utilizarea acestui medicament ridică câteva întrebări importante.

1. De ce era doctorul dumneavoastră îngrijorat de procentul ridicat de gene umane care sunt reduse la tăcere prin metilare în raport cu transcripția ?
2. Care gene ar putea cauza cele mai mari îngrijorări?
3. Ce criterii ați folosi atunci când decideți dacă să administrați un medicament precum 5-azacitidina?

Puncte de rezumat

1. Studiile timpurii ale codului genetic au arătat că acesta era compus din tripleți și nu se suprapunea, nu avea virgule și era generat .
2. Utilizarea homopolymerilor și a amestecurilor de copolimeri ARN într-un sistem de sinteză a proteinelor fără celule a făcut posibilă determinarea compoziției, dar nu și a secvenței , codonilor care desemnează fiecare aminoacid specific.
3. Utilizarea testelor de legare tripletă și a copolimerilor repetați a făcut posibilă determinarea secvențelor specifice de codoni care desemnează fiecare aminoacid specific .
4. Codul genetic complet arată că, dintre cei 64 de codoni posibili , 61 codifică cei 20 de aminoacizi găsiți în proteine , în timp ce trei tripleți termină traducerea . Unul dintre acești 61 de codoni este codonul de început și specifică metionina .
5. Confirmarea dicționarului de codificare, inclusiv a codonilor de început și de sfârșit , a fost obținută prin compararea secvențelor complete de nucleotide ale fagului MS2 cu secvențele de aminoacizi ale proteinelor corespunzătoare . Alte descoperiri susțin convingerea că acest cod este, cu câteva excepții minore , universal pentru toate organismele .

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare , vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

6. Transcripția — etapa inițială a expresiei genelor — este sinteza , sub conducerea ARN polimerazei , a unui lanț de ARN complementar unui șablon de ADN .
7. Procesul de transcripție , la fel ca replicarea ADN-ului , poate fi subdivizat în etapele de inițiere, elongație și terminare. De asemenea, la fel ca replicarea ADN-ului , transcripția se bazează pe afinitățile dintre nucleotidele complementare .
8. Inițierea transcripției depinde de o regiune din amonte (5') a ADN-ului numită promotor, care reprezintă situsul inițial de legare al ARN polimerazei . Promotorii conțin secvențe specifice de ADN , cum ar fi cutia TATA, care sunt esențiale pentru legarea polimerazei.
9. Procesul de creare a transcrierii inițiale în timpul transcripției este mai complex la organismele eucariote decât la cele procariote, incluzând adăugarea unui capac de 7 mG la 5' și a unei cozi poli -A la 3' la pre-ARNm.
10. primară la eucariote reflectă prezența secvențelor intermediare sau a intronilor care sunt prezenți în ADN și care trebuie eliminați pentru a crea ARNm matur.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Calculați câți codoni ar fi posibili dacă evoluția ar fi dus la utilizarea a șase baze (trei perechi de baze complementare) în loc de patru baze pentru a construi ADN-ul. Ar putea șase baze să găzduiască un cod de două litere, presupunând existența a 20 de aminoacizi și a codonilor de început și de sfârșit?

   Soluție. Șase baze luate câte trei odată produc (6) ^{3} sau 216 codoni. Dacă codul ar fi un dublet, ar exista (6) ^{15}sau 36 de codoni de două litere, suficienți pentru a conține 20 de aminoacizi și semnalele de început și de sfârșit.

2. Dacă un experiment cu heteropolimeri utilizează 1/2C:1/4A:1/4G, câte triplete diferite vor apărea în molecula de ARN sintetică? Cât de des va apărea tripleta cea mai frecventă?

   Soluție. Vor exista (3) ^{3} sau 27 de codoni. Cel mai frecvent va fi CCC, care va apărea (1/2) ^{3} sau 1/8 din cazuri.

3. Într-un experiment tipic cu copolimer, în care UUAC este repetat, câte triplete diferite vor exista în ARN-ul sintetic și câți aminoacizi diferiți vor fi produși în polipeptidă atunci când ARN -ul este tradus ? Vezi Figura 13.7.

   Soluție. În ARN-ul sintetic, se vor repeta patru triplete — UUA, CUU, ACU și UAC —. Deoarece UUA și CUU codifică leucina, iar ACU și UAC codifică treonina și respectiv tirozina, polipeptidele sintetizate dirijate de acest ARN vor conține trei aminoacizi diferiți în secvența leu-leu-thr-tyr, care se va repeta.

4. Actinomicina D inhibă sinteza ARN dependentă de ADN . Acest antibiotic este adăugat la o cultură bacteriană în care este monitorizată o proteină specifică . Comparativ cu o cultură de control în care nu s-a adăugat niciun antibiotic , traducerea proteinei scade pe o perioadă de 20 de minute, până când nu se mai produce proteină . Explicați aceste rezultate.

   Soluție. ARNm-ul , care stă la baza translației proteinelor , are un timp de înjumătățire de aproximativ 20 de minute. Când se adaugă actinomicină D , transcripția este inhibată și nu se sintetizează ARNm nou . ARNm - ul existent menține

Problemas y preguntas para la discusión

CÓMO IO SABEMOS <

Pentru a vedea problemele și muritorii atribuiți de profesor, vă rugăm să vizitați www.tnasteringgenelics.com

1. În acest capitol, ne -am concentrat asupra codului genetic și a transcrierii informațiilor genetice stocate în ADN în molecule de ARN complementare. Pe parcursul procesului, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol , ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale ?

   (a) De ce au crezut geneticienii acest lucru chiar înainte de a-l obține?

4. Ce dovezi experimentale directe au arătat că codul genetic ar fi compus din tripleți și nu s-ar suprapune? Cum s-au dovedit experimental că aceste presupuneri sunt corecte?

   (b) Ce dovezi experimentale au furnizat primele idei

5. Dar cum rămâne cu compoziția codonilor care codifică anumiți aminoacizi?

   (c) Cum au fost determinate experimental secvențele specifice ale codului triplet?

   (d) Cum au fost verificați experimental codonii?

   folosind bacteriofagul MS2?

   (e) Ce dovezi avem că informația codificată în ADN implică un intermediar ARN?

   (f) De unde știm că genele eucariote conțin secvențe necodificatoare care trebuie eliminate din ARN-ul intermediar înainte de a fi traduse în proteine?

de polipéptidos de forma directa *(véase* Gamow, 1954, en Lecturas seleccionadas). En eucariontes, ¿qué dificultades tendría este sistema? ¿Qué observaciones y qué consideraciones teóricas dan argumentos en contra de esta propuesta?

En sus trabajos de mutaciones de cambio de fase, Crick, Barnett, Brenner y Watts-Tobin encontraron que cada tres (+) o tres (—) restauraban la fase de lectura correcta, (a) Suponiendo que el código es un triplete, ¿qué efecto tendría sobre la fase de lectura la adición o eliminación de seis nucleótidos? (b) Si el código fuese un sextuplete (formado por seis nucleótidos) ¿se restauraría la fase de lectura al añadirse o perderse tres, seis o nueve nucleótidos?

El ARNm formado por el tetranucleótido repetido UUAC incorpora solo tres aminoácidos, mientras que la utilización del UAUC incorpora cuatro. ¿Por qué?

En experimentos en que se utilizan copolímeros repetidos, el AC... incorpora treonina e histidina, y el CAACAA... incorpora glutamina, asparragina y treonina. ¿Qué triplete puede asignase con toda seguridad a la treonina?

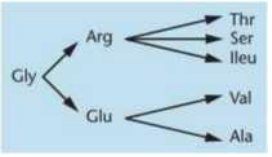
6. En un experimento en que se utilizaron copolímeros repetidos (como los mostrados en la Tabla 13.3), se obtuvieron los siguientes datos:

Copolímeros	Codones producidos	Aminoácidos en el polipéptido
AG	AGA, GAG	Arg, Glu
AAG	AGA, AAG, GAA	Lys, Arg, Glu

15 Primele propuneri despre codul genetic au luat în considerare posibilitatea ca ADN-ul să servească drept șablon pentru sinteză

Se știe că AGG codifică arginina. Având în vedere ipoteza oscilației , atribuiți fiecăruia dintre cei patru codoni produși în experiment aminoacidului corespunzător.

7. În tehnica de legare a tripletului , radioactivitatea rămâne pe filtru atunci când aminoacidul corespunzător tripletului respectiv este marcat. Explicați principiile acestei tehnici .
8. a fost determinată secvența de aminoacizi a insulinei izolate din diferite organisme , s-au observat unele diferențe. De exemplu, în pozițiile corespondente din proteină, alanina a fost înlocuită cu treonină , serina cu glicină și valina cu izoleucină . Enumerați modificările la o singură bază care ar fi putut apărea în codonii codului genetic pentru a produce aceste modificări de aminoacizi .
9. În studiile secvenței de aminoacizi a formelor sălbatice și mutante ale triptofan sintazei de la *E. coli,* s-au observat următoarele modificări:



Determinați un set de triplete în care o singură modificare a nucleotidului produce fiecare modificare a aminoacidului.

10. De ce polinucleotida fosforilaza (enzima Ochoa) nu sintetizează ARN *in vivo?*
11. Consultați tabelul 13.1. Puteți oferi o ipoteză cu privire la motivul pentru care un amestec de poli U + poli A nu ar stimula încorporarea fenilalaninei - ^{HC} în proteină ?
12. Preziceți secvența de aminoacizi care apare în timpul traducerii următoarelor secvențe teoretice de ARNm (rețineți că a doua secvență este formată din prima prin deleția unui nucleotid):

Secvența 1: 5'-AUGCCGGAUUAUAGUUGA-3'
Secvența 2: 5'-AUGCCGGAUUAAGUUGA-3'

Ce tip de mutație a generat secvența 2 ?

13. A fost izolată o moleculă scurtă de ARN care a prezentat o modificare hipercromă indicativă a structurii secundare. Secvența a fost determinată a fi

AGGCGCCGACUCUACU

(a) Propuneți un model bidimensional pentru această moleculă.
(b) Ce secvență de ADN ar produce această moleculă de ARN prin transcripție?
(c) Dacă molecula ar fi un fragment de ARNt care conține anticodonul CGA, care ar fi codonul corespunzător ?
(d) Dacă molecula ar fi o parte internă a unui mesaj, ce secvență de aminoacizi ar rezulta după traducere ? (Consultați tabelul de coduri din Figura 13.7)

14. La poziția 210 a enzimei triptofan sintază de tip sălbatic a *E. coli* , există un reziduu de glicină. Dacă codonul care specifică glicina este GGA, câte substituții cu o singură bază ar duce la o substituție de aminoacid la poziția 210? Care sunt acestea? Câte ar exista dacă codonul de tip sălbatic ar fi GGU?
15. Folosește Figura 13.7 pentru a răspunde la această întrebare:
(a) Următoarea este o secvență teoretică a unui ARNm viral:

5 -AUGCAUACCUAUGAGACCCUUGGA-3'

Presupunând că poate proveni din gene care se suprapun, câte secvențe polipeptidice diferite pot fi produse? Care sunt aceste secvențe?
(b) O mutație de substituție cu o singură bază care modifică secvența de mai sus (a) elimină sinteza tuturor polipeptidelor , cu excepția uneia . Secvența modificată este prezentată mai jos :

5' -AUGCAUACCUAUGUGACCCUUGGA-3'

Stabiliți de ce .

16. Multe proteine au mai multe reziduuri de leucină decât reziduuri de histidină și mai multe reziduuri de histidină decât triptofan. Relaționați numărul de codoni pentru acești trei aminoacizi cu informațiile de mai sus .
17. Definiți procesul de transcripție. Unde se încadrează acest proces în dogma centrală a geneticii moleculare (ADN-ul produce ARN , iar ARN-ul produce proteine)?
18. Care a fost prima dovadă a existenței ARNm?
19. Descrieți structura ARN polimerazei la bacterii. Ce este nucleul enzimei? Care este funcția subunității α?
20. Descrieți într- un singur paragraf reacțiile chimice prescurtate care rezumă transcripția dirijată de ARN polimerază.
21. Moleculele de ARN mesager sunt foarte dificil de izolat la procariote , deoarece acestea sunt de obicei degradate rapid în interiorul celulei. Puteți sugera un motiv pentru care se întâmplă acest lucru? ARNm-urile eucariote sunt mai stabile și durează mai mult în celulă decât ARNm-urile procariote. Este acesta un avantaj sau un dezavantaj pentru o celulă pancreatică care produce cantități mari de insulină?
22. Rezumați diferitele tipuri de procesare post-transcripțională la organismele eucariote . Oferiți câte un exemplu pentru fiecare.
23. O formă de modificare post-transcripțională a majorității transcrierilor de ARN eucariote implică adăugarea unei secvențe poli-A la capătul 3'. Absența unei secvențe poli-A duce la degradarea rapidă a transcrierii . Secvențe poli-A de lungimi variabile sunt, de asemenea, adăugate la multe transcrieri de ADN procariote , unde, în loc să promoveze stabilitatea, acestea promovează degradarea. În ambele cazuri, structurile secundare ale ARN-ului, proteinele stabilizatoare sau enzimele degradante interacționează cu secvențele poli-A. Având în vedere activitățile ARN - ului, care ar putea fi funcțiile generale ale 3'-poliadenilării?
24. Descrieți rolul a două forme de editare a ARN-ului care provoacă modificări ale dimensiunii și secvenței pre -ARNm. Descrieți pe scurt câteva exemple ale fiecărei forme de editare, inclusiv impactul lor asupra produselor proteice respective.
25. editarea ARN-ului prin substituție implică conversii de la C la U sau de la A la I. Ce evenimente chimice comune explică fiecare dintre aceste conversii?

Probleme suplimentare picante

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

a sugerat că actualul cod genetic triplet a evoluat dintr -un cod dublet care a fost utilizat atunci când erau disponibili mai puțini aminoacizi pentru sinteza proteinelor primitive .

(a) Puteți găsi date în dicționarul de codare existent în prezent care să susțină ideea de codare dubletă ?

(b) Aminoacizii Ala, Val, Gly, Asp și Glu sunt toți membri foarte timpurii ai căilor de procesare biosintetică (Taylor și Coates, 1989) și sunt mai conservați din punct de vedere evolutiv decât alți aminoacizi (Brooks și Fresco , 2003). Aceștia reprezintă probabil aminoacizi „timpurii". Care este semnificația acestor informații în explicarea evoluției codului genetic? În plus, care dintre cele două baze ar fi probabil mai semnificativă în specificarea inițială a acestor aminoacizi?

(c) Conform comparației proteinelor antice cu cele evoluate mai recent, cisternele, tirozina și fenilalanina par a fi aminoacizi apariți târziu . Mai mult, se crede că au fost absenți pe Pământ înainte de apariția vieții (Miller, 1987). Acești trei aminoacizi au fiecare doar doi codoni , în timp ce mulți alții de origine anterioară au mai mulți. Este aceasta o simplă coincidență sau ar putea exista o explicație ?

27. Într-un experiment de amestecare a copolimerilor, mesagerii au fost sintetizați cu 4/5C:1/5A sau 4 /5A:1/5C. Acești mesageri au produs - proteine cu următoarele compoziții de aminoacizi .

4/5C:1/SA		4/5A:1/5C	
Prolină	63,0%	Prolină	3,5%
Histidină	13,0%	Histidină	3,0%
Treonină	16,0%	Treonină	16,6%
Glutamină	3,0%	Glutamină	13,0%
Asparagină	3,0%	Asparagină	13,0%
Centrală electrică	0,5%	Centrală electrică	50,0%
	98,5%		99,1 %

Folosind aceste date, preziceți compoziția specifică în tripleți a fiecărui aminoacid.

28. ale unei proteine mici sunt prezentate mai jos . Folosiți aceste informații pentru a răspunde la următoarele întrebări:

sălbatic:	Met-Trp-Tyr-Arg-Gly-Ser-Pro-Thr
Mutantul 1:	Met-Trp
Mutantul 2:	Met-Trp-His-Arg-Gly-Ser-Pro-Thr
Mutantul 3:	Met-Cys-Ile-Val-Val-Val-GIn-His

(a) Folosind Figura 13.7, determinați tipul de mutație care a dus la fiecare proteină alterată.

(b) Pentru fiecare proteină mutantă, determinați modificarea specifică a ribonucleotidelor care a dus la sinteza sa.

(c) ARN-ul de tip sălbatic este format din nouă triplete. Care este funcția celei de-a noua triplete?

(d) Dintre primele opt triplete sălbatice, care poate fi determinat fără îndoială, dacă într-adevăr poate fi determinat ?

Ați folosit analiza proteinelor mutante în vreunul dintre cazuri? Explicați de ce ați folosit -o sau nu în fiecare caz.

(e) O altă mutație (Mulant 4) a fost izolată. Secvența sa de aminoacizi nu este modificată, dar celulele mutante produc cantități anormal de mici din - proteina de tip sălbatic . Preziceți, cât mai precis posibil, unde în genă este localizată mutația .

29. Codul genetic este degenerat. Aminoacizii sunt codificați de 1, 2, 3 , 4 sau 6 codoni într-un triplet *(vezi* Figura 13.7). O întrebare interesantă este dacă numărul de tripleți corespunzători fiecărui aminoacid este legat în vreun fel de frecvența cu care acel aminoacid apare în proteine. Cu alte cuvinte, este codul genetic optimizat pentru utilizarea pentru care a fost conceput? Mai jos este o aproximare a frecvenței de apariție a nouă aminoacizi în proteinele E. coli *:*

Aminoacid	Procent
Met	2
Cy 5	2
Gin	5
Pro	5
Arg	5
minciună	6
Glu	7
Către	8
Leu	10

(a) Determinați câte triplete codifică fiecare aminoacid.

(b) Proiectați un sistem care să reprezinte grafic cele două seturi de informații (datele).

(c) Analizați- vă datele pentru a determina ce corelații , dacă există, pot fi stabilite între frecvența relativă a aminoacizilor care alcătuiesc proteinele și numărul de codoni pentru fiecare aminoacid . Scrieți un paragraf în care să prezentați concluziile specifice și generale .

(d) Care ar fi următorii pași dacă aș vrea să continui analizarea acestei probleme ?

30. Așa cum este descris în Capitolul 12, elementele Alu proliferează în *genomul* uman printr- un proces numit transcripție inversă, în care secvența de ADN *Alu* Este transcris în ARN, copiat în ADN bicatenar și inserat în genom într - un loc departe de cel al genei sale *Alu* . „strămoș". Este clar că acest proces este extrem de eficient, deoarece genele *Alu* au proliferat până la aproximativ 10^{6} copii în genomul uman . Această eficiență se datorează în mare măsură faptului că elementele Alu , Ca multe ARN-uri structurale, acestea poartă propriile secvențe de promotor *în regiunea transcrisă a genei,* în loc să se afle la 5 ' în amonte de situsul de inițiere a transcripției . Dacă elementele *Alu* și- ar purta promotorii în amonte de situsul de inițiere a transcripției, similar genelor care codifică proteine , ce s-ar întâmpla odată ce acestea ar fi retrotranspuse? Ar fi o secvență Alu capabilă să *prolifereze* ? Retrotranspus? Explicați.

31. M. Klemke și colegii săi (2001) au descoperit un fenomen interesant de codificare în care un singur exon dintr-

o genă pentru un receptor neurohormonal la mamifere pare să producă două proteine diferite (XLas și ALEX). Secvența de ADN de la capătul 5 ' al exonului unei gene de șobolan este prezentată mai jos . Literele mici reprezintă porțiunea codificatoare inițială a proteinei XLas, iar literele mari indică porțiunea în care începe proteina ALEX. (Pentru simplitate și pentru alinierea cu dicționarul de coduri ARN , este de obicei reprezentat segmentul de ADN al catenei necodificatoare, cel care nu acționează ca șablon.)

5 ' -gtcccaaccatgcccaccgatcttccgcctgctctgaagATGCGGGCCC AG

(a) Conversia secvenței de ADN necodificatoare în secvența de ARN codificatoare .

(b) Localizați codonul de început al segmentului XLas.

(c) Localizați codonul de început al segmentului ALEX . Ambii codoni de început au același model de citire?

(d) Furnizați secvența de aminoacizi a ambelor secvențe codificatoare. În regiunea de suprapunere , sunt cele două secvențe de aminoacizi identice?

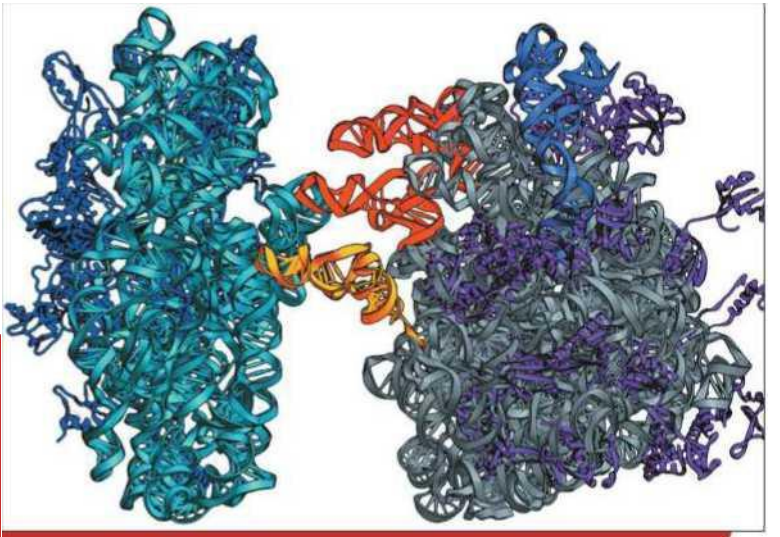
(e) Există avantaje evolutive în a avea aceeași secvență codificatoare de ADN pentru două produse proteice? Există dezavantaje?

32. Acest capitol a introdus conceptul de secvențe consens de ADN , care sunt secvențe similare (omoloage) în gene diferite ale aceluiași organism sau în gene ale unor organisme diferite. Exemplele date sunt regiunea Pribnow și regiunea -35 la procariote , precum și regiunea TATA la eucariote. Un studiu a stabilit că printre 73 de probe de virus HIV de tip 1C (principala cauză a epidemiei de SIDA), există o secvență consens GGGNNNNNCC (unde N este orice bază azotată) în regiunea promotor-amplificator a factorului de transcripție NF-κB , un element cis - activ care este critic pentru inițierea transcripției HIV în macrofagele umane (Novitsky et al., 2002). Autorii afirmă că descoperirea acestei secvențe conservate și a altora ar putea fi valoroasă pentru proiectarea unui vaccin împotriva SIDA . Ce avantaje ar oferi cunoașterea acestor secvențe consens? Există dezavantaje pentru proiectarea vaccinurilor ?

33. Observații recente indică faptul că splicing-ul alternativ este un mecanism comun la eucariote pentru a- și extinde repertoriul de funcții genetice . Studiile au arătat că aproximativ 50 % din genele umane utilizează splicing alternativ și că aproximativ 15% din mutațiile care cauzează boli implică splicing alternativ aberant . Țesuturi diferite prezintă frecvențe extraordinar de diferite de splicing alternativ , creierul fiind responsabil pentru aproximativ 18 % din aceste evenimente. (Xu și colab ., 2002. *Nuc. Acid. Res.* 30:3754-66)

(a) Definiți ce este mecanismul alternativ de tăiere și îmbinare și speculați asupra strategiei evolutive pe care acest mecanism o oferă organismelor.

(b) De ce ar utiliza unele țesături mecanismul alternativ de tăiere și îmbinare mai mult decât altele ?



Structura cristalină a ribozomului 70S de la *Thermus thermophilus*, cu trei ARN-uri de transfer atașate care leagă cele două subunități. *Imagine furnizată de Dr. Albion Baucom (baucom@biology.ucsc.edu). Reprodusă de pe coperta revistei Science, vol. 292, 4 mai 2001.*

14 Traducere și proteine

CONCEPTE CAPITOL

►► **Secvența de ribonucleotide a ARN-ului mesager (ARNm) reflectă informația genetică stocată în ADN-ul care formează genele și corespunde secvenței de aminoacizi a proteinelor pe care acestea le codifică.**

►► **Procesul de traducere decodează informațiile din ARNm, ducând la sinteza lanțurilor polipeptidice.**

►► **Traducerea implică interacțiunile dintre ARNm, ARNt, ribozomi și diverși factori de traducere care sunt esențiali pentru inițierea , alungirea și terminarea lanțului polipeptidic.**

►► **Proteinele, produsul final al majorității genelor, dobândesc o conformație tridimensională a cărei bază este secvența primară de aminoacizi ai lanțurilor polipeptidice care formează fiecare proteină. Funcția tuturor proteinelor este strâns legată de structura lor tridimensională , care poate fi modificată prin mutație .**

lire sterline

În Capitolul 13, s-a stabilit că un cod genetic stochează informații sub formă de codoni în ADN și că, prin procesul de transcripție, aceste informații sunt inițial exprimate în ARN mesager (ARNm) complementar catenei matriță a helixului ADN. Cu toate acestea, în majoritatea cazurilor, produsul final al expresiei genelor este un lanț polipeptidic alcătuit dintr-o serie liniară de aminoacizi a căror secvență este dictată de codul genetic. În acest capitol, vom examina modul în care informațiile din ARNm sunt traduse pentru a genera polipeptide, care sunt apoi pliate în molecule proteice. De asemenea, vom trece în revistă dovezile care confirmă că proteinele sunt produsul final al genelor și vom discuta pe scurt diferitele niveluri de structură, diversitate și funcție a proteinelor. Aceste informații ne extind înțelegerea expresiei genelor și oferă o bază importantă pentru interpretarea modului în care mutațiile din ADN pot duce la diversele efecte fenotipice observate la organisme.

14.1

Traducerea ARNm depinde de ribozomi și ARN-uri de transfer.

Traducerea ARNm este polimerizarea biologică a aminoacizilor în lanțuri polipeptidice. Acest proces, care a fost discutat în legătură cu codul genetic, are loc doar în asociere cu ribozomii, care servesc drept banc de lucru nespecific. Întrebarea fundamentală în traducere este modul în care codonii ARNm direcționează aminoacizii specifici către pozițiile lor corecte în polipeptidă. Descoperirea ARN-ului de transfer (ARNt) a răspuns la această întrebare. Aceste molecule potrivesc aminoacidul corect cu codonii specifici ARNm. După cum am menționat în Capitolul 13, în 1957, Francis Crick a postulat necesitatea unui fel de „adaptor".

În asociere cu un ribozom, ARNm prezintă un codon care solicită aminoacidul său specific. O anumită moleculă de ARNt conține în secvența sa trei ribonucleotide consecutive complementare codonului; acestea se numesc anticodoni, care se pot împerechea cu codonul. O altă regiune a acestui ARNt este legată covalent de aminoacidul corespunzător.

În ribozom, legăturile de hidrogen dintre ARNt și ARNm țin aminoacizii aproape unul de celălalt, permițând formarea legăturilor peptidice. Acest proces are loc continuu pe măsură ce ARNm se deplasează prin ribozom, iar aminoacizii polimerizează într- un lanț polipeptidic . Înainte de a examina mai detaliat procesul propriu-zis de translație , vom lua în considerare mai întâi structurile ribozomului și ale ARN-ului de transfer .

Structura ribozomilor

Datorită rolului său esențial în exprimarea informației genetice, ribozomul a fost studiat pe larg. O celulă bacteriană conține aproximativ 10.000 de ribozomi, iar o celulă eucariotă conține mult mai mulți. Microscopia electronică a relevat că cel mai mare diametru al ribozomului bacterian măsoară aproximativ 250 µm și că este compus din două subunități, una mare și una mică. Ambele subunități conțin una sau mai multe molecule de ARNr și o colecție de proteine ribozomale . Uneori, când cele două subunități se asociază într- un singur ribozom, structura se numește monosom.

Principalele diferențe dintre ribozomii procarioți și eucarioți - sunt rezumate în Figura 14.1. Cea mai bună metodă de a izola și caracteriza subunitățile și componentele ARNr se bazează pe comportamentul lor de sedimentare (rata lor de migrare în timpul centrifugării, prescurtată S, de la Svedberg, așa cum se explică în Capitolul 10) în gradienți de zaharoză . La procariote, monosomul este o particulă 70S , iar la eucariote este de aproximativ 80S. Coeficienții de sedimentare, care reflectă variația ratei de migrare a particulelor și moleculelor de diferite dimensiuni, nu sunt aditivi. De exemplu, monosomul procariot 70S este format dintr -o subunitate 50S și o subunitate 30S , iar monosomul eucariot 80S este format dintr-o subunitate 60S și o subunitate 40S .

La procariote, subunitatea mare este formată dintr-o moleculă de ARNr 23S , o moleculă de ARNr 5S și 31 de proteine ribozomale. În echivalentul eucariot, o moleculă de ARNr 28S este însoțită de o moleculă de ARNr 5,8S, o moleculă de ARNr 5S și aproximativ 46 de proteine . Subunitățile procariote mici sunt formate dintr -o componentă de ARNr 16S și 21 de proteine. În echivalentul eucariot , există o componentă de ARNr 18S și aproximativ 33 de proteine. Figura 14.1 prezintă greutatea moleculară aproximativă (în daltoni, Da) și numărul de nucleotide ale acestor componente.

Acum este clar că ARN -urile care alcătuiesc ribozomii oferă baza pentru toate funcțiile catalitice importante asociate cu traducerea. Se crede că numeroasele proteine ribozomale , a căror funcție a fost mult timp un mister , promovează legarea diferitelor molecule implicate în traducere și, în general , contribuie la reglarea fină a întregului proces. Această concluzie se bazează pe observația că unele dintre funcțiile catalitice ale ribozomilor continuă să apară în experimentele care utilizează ribozomi „ lipsiți de proteine ribozomale "

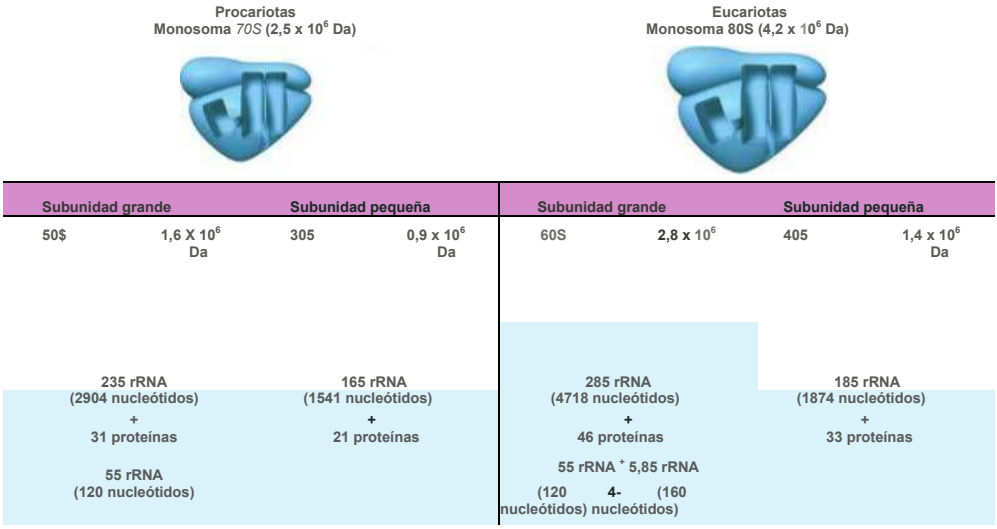


FIGURA 14.1 Comparación de los componentes de los ribosomas procarióticos y eucarióticos.

.

Studiile de hibridizare moleculară au stabilit gradul de redundanță al genelor care codifică componentele ARNr. Genomul *E. coli* conține șapte copii ale unei secvențe care codifică cele trei componente - 23, 16 și 5. Transcrierea inițială a fiecărui set al acestor gene produce o moleculă de ARN de 30% care este scindată enzimatic pentru a forma aceste componente mai mici. Cuplarea informațiilor genetice care codifică aceste trei componente ale ARNr asigură că, după evenimente multiple de transcripție, sunt prezente cantități egale din toate cele trei pe măsură ce ribozomii se asamblează.

La eucariote, există mult mai multe copii ale secvenței care codifică componentele 28S, 18S și 5.8S. La *Drosophila* , aproximativ 120 de copii per genom haploid sunt transcrise într-o moleculă de aproximativ 45S. Aceasta este procesată pentru a forma ARNr 28S, 18S și 5.8S. Aceste tipuri de ARNr sunt omoloage cu cele trei componente ARNr ale *E. coli.* La *Xenopus laevis,* există peste 500 de copii ale componentei 34S per genom haploid. În celulele mamiferelor , transcrierea inițială este 45S. Genele ARNr , numite ARNr, fac parte din fracțiunea de ADN moderat repetitivă și sunt grupate în diverse locații cromozomiale.

La eucariote, fiecare grup este format din repetiții în tandem, iar fiecare unitate este separată printr-o secvență necodificatoare de ADN de splicing. La oameni, aceste grupuri de gene sunt situate în apropierea capetelor cromozomilor 13, 14, 15, 21 și 22. - Componenta ARNr 5' din eucariote nu face parte din această transcriere mai mare. În schimb, genele care codifică componenta ribozomală 5 ' sunt distincte și situate separat. La oameni , un grup de gene care codifică ARNr 5' a fost localizat pe cromozomul 1 .

În ciuda cunoștințelor detaliate disponibile despre structura și originea genetică a componentelor ribozomale, geneticienii nu au ajuns încă la o înțelegere completă a funcției lor . Acest lucru nu este surprinzător, deoarece ribozomul este cea mai mare și probabil cea mai complexă dintre structurile celulare . De exemplu , la bacterii , monosomul are o greutate moleculară combinată de 2,5 milioane de daltoni .

Structura ARNt

Datorită dimensiunilor lor mici și stabilității în interiorul celulei, ARN-urile de transfer (ARNt) au fost studiate pe larg și sunt cele mai bine caracterizate molecule de ARN . Acestea constau din 75 până la 90 de nucleotide și prezintă o structură aproape identică la bacterii și eucariote. La ambele tipuri de organisme, ARNt-urile sunt transcrise din ADN sub formă de precursori mai mari , care sunt apoi scindați pentru a forma molecule de ARNt mature . La E. *coli,* de exemplu, ARNt¹ (exponentul identifică ARNt-ul specific în funcție de aminoacidul care se leagă de el, numit mugure de aminoacid *)* constă din 77 de nucleotide , deși precursorul său conține 126.

În 1965 , Robert Holley și colaboratorii săi [au] publicat secvența completă a ARNt Ala . izolat în drojdie. A fost

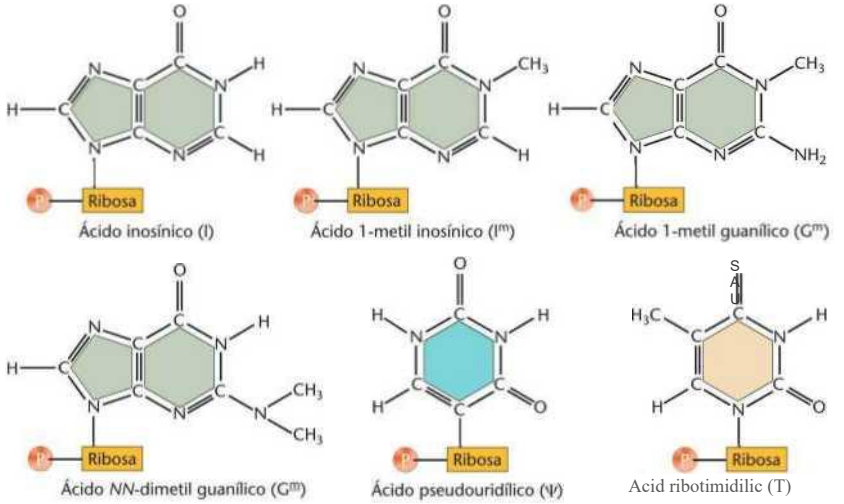


FIGURA 14.2 Ribonucleotidele care conțin baze azotate neobișnuite găsite în ARN-ul de transfer.

De mare interes este descoperirea sa că mai multe nucleotide sunt specifice ARNt , fiecare conținând ceea ce se numește o *bază modificată.* Așa cum este ilustrat în Figura 14.2, fiecare dintre aceste nucleotide conține o modificare a uneia dintre cele patru baze azotate așteptate în ARN (G, C, A și U). Figura prezintă acid inozinic (care conține purina hipoxantina), acid ribotimidilic, pseudouridina și multe altele. Alte exemple includ acidul ribotimidilic și pseudouridina . Aceste structuri modificate sunt create *după* transcripție , ilustrând conceptul mai general de modificare post-transcripțională . În acest caz, în timpul transcripției ARNt , baza nemodificată este inserată, iar ulterior, - reacțiile enzimatice catalizează modificările chimice ale bazei. Comparați structura acestor nucleotide cu cele cinci nucleotide standard prezentate și ilustrate în Capitolul 10. Deși rămâne neclar de ce sunt create aceste baze modificate , se crede că prezența lor sporește eficiența legăturilor de hidrogen în timpul translației.

Analiza secvenței realizată de Holley l-a condus la propunerea modelului bidimensional de trifoi al ARNt. El știa deja că ARNt are o structură secundară caracteristică , creată prin împerecherea bazelor. Holley a descoperit că putea aranja secvența liniară în așa fel încât să se formeze mai multe segmente de împerechere a bazelor . Acest aranjament, cu seria sa de tulpini împerecheate și bucle neperecheate, seamănă cu forma unui trifoi. Buclele conțineau întotdeauna baze modificate care, în general , nu formau perechi de baze. Modelul lui Holley este prezentat în Figura 14.3.

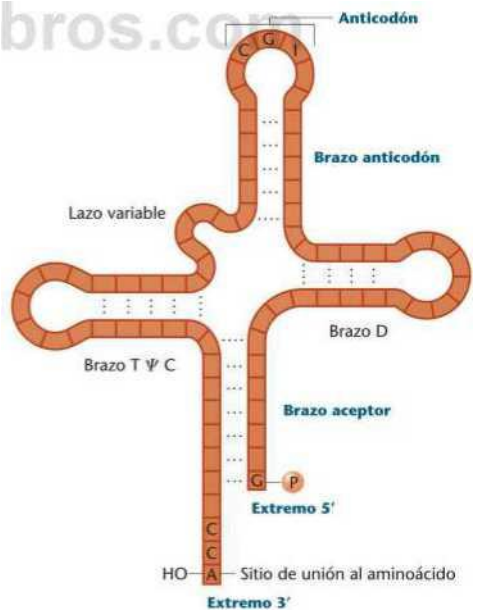


FIGURA 14.3 Modela bidimensional de la hoja de rrébol de Holley det ARN transference. Los enlaces de hidrógeno se indican mediante puntos (...).

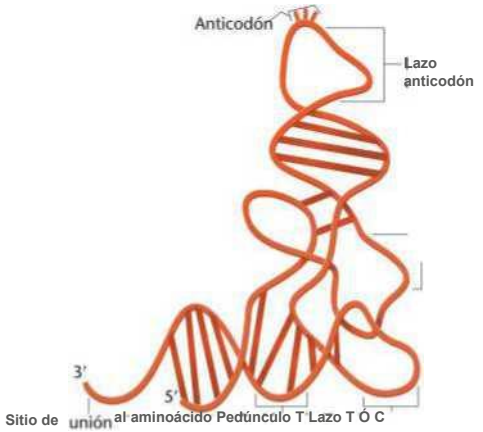


FIGURA 14.4 Model tridimensional al ARN-ului de transfer.

Deoarece tripleții GCU , GCC și GCA specifică alanina , Holley a căutat în molecula sa ARNi o secvență anticodonică complementară unuia dintre acești codoni . A găsit-o sub formă de CGI (în direcția 3' către 5') într-una dintre buclele trifoi . Baza azotată I (acidul inozinic) poate forma legături de hidrogen cu U, C sau A în al treilea membru al tripleților de alanină. Aceasta a stabilit bucla anticodonică.

După examinarea altor clase de ARNt, au fost observate numeroase caracteristici consistente . În primul rând, la capătul 3', toate ARNt-urile au secvența (...pCpCpA-37) . La acest capăt al moleculei , aminoacidul este legat covalent de reziduul acestei adenozine terminale . La celălalt capăt al moleculei, toate ARNt-urile conțin nucleotida (5' - pG...). În plus, lungimile diferitelor tulpini și bucle de pe moleculele de ARNt sunt similare. Fiecare ARNt examinat conține , de asemenea, un anticodon complementar codonului cunoscut al aminoacidului de care este atașat ARNt-ul, iar toate buclele anticodonului se află în aceeași poziție pe frunză de trifoi.

Întrucât modelul trifoi a fost prezis exclusiv pe baza secvenței de nucleotide , a existat un mare interes pentru examinarea cristalografică cu raze X a ARNt, care dezvăluie structura tridimensională. În 1974, Alexander Rich și colaboratorii săi din Statele Unite, și J. Roberts, B. Clark, Aaron Klug și colaboratorii lor din Anglia , au reușit să cristalizeze și să efectueze cristalografie cu raze X a ARNt la o rezoluție de 3 Å. La această rezoluție, modelul format de nucleotidele individuale este discernabil .

Ca urmare a acestor studii, este acum disponibil un model tridimensional complet al ARNt (Figura 14.4) . Au fost localizate bucla anticodonică și regiunea acceptoare 3 ' (unde aminoacidul este atașat covalent) . Geneticienii speculează că tiparele buclelor intermediare sunt recunoscute de enzimele responsabile de atașarea aminoacizilor la ARNt - un subiect pe care îl vom discuta în continuare.

Sarcina ARNt

Înainte ca traducerea să poată avea loc, moleculele de ARNt trebuie să se lege chimic de aminoacizii respectivi . Acest proces de activare, numit încărcare sau *aminoacilare,* este dirijat de enzime numite aminoacil-ARNt sintetaze. Deoarece există 20 de aminoacizi diferiți , trebuie să existe cel puțin 20 de molecule de ARNt diferite și un număr egal de enzime. În teorie, deoarece există 61 de triplete care codifică aminoacizi, ar putea exista 61 de ARNt și enzime specifice. Cu toate acestea, datorită capacității de oscilație a celui de-al treilea membru al unui triplet codificator, numărul minim de ARNt diferite necesar este de doar 3. În realitate, există mai mult de 31. Se crede, de asemenea, că există doar 20 de sinretaze, câte una pentru fiecare aminoacid, indiferent dacă numărul de ARNt corespunzătoare este mai mare sau nu.

Figura 14A ilustrează procesul de încărcare. În etapa inițială, aminoacidul este convertit în forma sa activată,

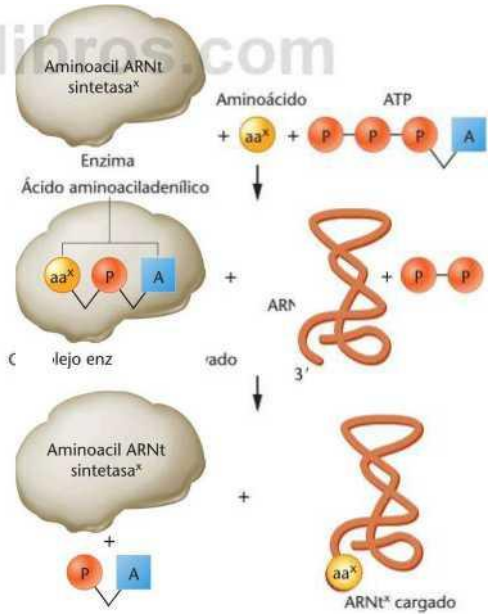


FIGURA 14.5 Etapele procesului de încărcare a ARNt. Superscriptul x indică faptul că, pentru fiecare aminoacid, la procesul de încărcare participă doar ARNt-ul specific și enzima aminoacil ARNt sintetază specifică.

reacționând cu ATP pentru a forma un acid aminoacil-adenilic. Se formează o legătură covalentă între gruparea fosfat 5' a ATP și capătul carboxil al aminoacidului. Această moleculă rămâne asociată cu enzima sintază, formând un complex care reacționează cu molecula specifică de ARNt. În etapa următoare, aminoacidul este transferat la ARNt-ul corespunzător și atașat covalent la reziduul de adenină de la capătul 3'. ARNt-ul încărcat poate apoi participa direct la sinteza proteinelor . Aminoacil-ARNt sintetazele sunt enzime extrem de specifice, deoarece recunosc doar un aminoacid și subsetul de ARNt-uri corespunzător acelui aminoacid , numite ARNt-uri izoacceptoare. Acest lucru este crucial pentru menținerea fidelității traducerii .

ACUM REZOLVĂ ASTA

14.1 În 1962, F. Chapeville și colaboratorii săi au făcut public un experiment în care au izolat ^{14C}-cisteinil-ARNt ^{Cys} radioactiv (ARNt ^{Cys}) încărcat + cisteină). Apoi au îndepărtat gruparea sulfură din cisteină, generând alanil-ARNt ^{Cys} (^{Cys} încărcat ARNt + alanină). Când alanil-ARNt ^{Cys} a fost adăugat la un ARNm sintetic care codifica cisteina, dar nu alanina , a fost sintetizat un lanț polipeptidic care conține alanină . Ce se poate concluziona din acest experiment?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă încearcă să determine dacă ARNt-ul sau aminoacidul adăugat la ARNt-ul în timpul încărcării este responsabil pentru atragerea ARNt -ului încărcat către ARNm în timpul traducerii. Cheia rezolvării acestei probleme constă în observarea faptului că, în acest experiment, atunci când codonul codifică cisteina , alanina este inserată în timpul traducerii, chiar dacă este aminoacidul „incorect".*

14.2

Traducerea ARNm poate fi împărțită în trei etape

La fel ca transcripția, procesul de traducere poate fi cel mai bine descris prin împărțirea lui în faze discrete. Vom considera trei faze, fiecare cu propriul set de ilustrații (Figurile 14.6, 14.7 și 14.8), dar cu înțelegerea faptului că traducerea este un proces continuu și dinamic . Pe măsură ce citiți explicațiile următoare, urmați evenimentele prezentate în figuri pas cu pas. Mulți dintre factorii proteici și funcțiile lor în traducere sunt prezentate în Tabelul 14.1.

Inițiere

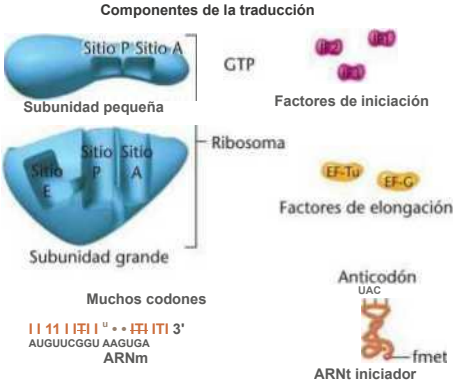
Inițierea traducerii la procariote este prezentată în Figura 14.6. Reamintim că ribozomii servesc drept banc de lucru nespecific pentru procesul de traducere . Atunci când nu participă la traducere, ribozomii se disociază în subunitățile lor mare și mică. Inițierea traducerii la E. *coli* implică subunitatea ribozomală mică , o moleculă de ARNm, un ARNt inițiator încărcat specific, GTP, $Mg2^{+}$ și trei factori de inițiere proteici (FI) care cresc afinitatea de legare a diferitelor componente ale translației. La procariote, codonul de inițiere a ARNm —AUG— specifică aminoacidul modificat N-formilmetionină (f-Met).

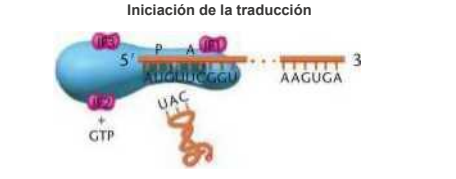
Subunitatea ribozomală mică se leagă de mai mulți factori de inițiere, iar acest complex se leagă apoi de ARNm (Pasa 1). La bacterii, această legare implică o secvență de până la șase ribonucleotide (AGGAGG, neprezentată în Figura 14.6), care *precede* codonul de inițiere AUG al ARNm. Această secvență (care conține doar purine și este numită secvența Shine-Dalgarno) realizează împerecherea bazelor cu o regiune a ARN-ului 16S al subunității ribozomale mici, facilitând inițierea .

Apoi, o altă proteină de inițiere facilitează legarea ARNt-ului formilmetioninei încărcat la subunitatea mică , ca răspuns la tripletul AUG (Pasa 2). Această etapă „ajustează" cadrul de citire astfel încât toate grupurile ulterioare de trei ribonucleotide să fie traduse cu precizie. Acest agregat este complexul de inițiere, care apoi se combină cu subunitatea mare ribozomală. În acest proces, o moleculă de GTP este hidrolizată, furnizând energia necesară, iar factorii de inițiere sunt eliberați (Pasa 3).

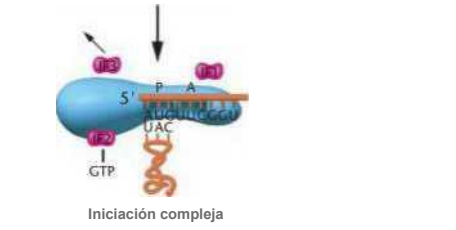
Diverși factori proteici implicați în traducere în E. *coli*

Procesul	factorial	Funcție
Inițiere IF1		Stabilizează subunitatea 305.
Traducere	IF2	Se leagă de ARNt-fmet la complexul 305-ARNm; se leagă de GTP și stimulează hidroliza.
	IF3	Atașați subunitatea 305 la ARNm; disociați monozomii în subunități după terminare.
Alungirea Polipeptida	EF-Tu	Se leagă de G1P; transportă aminoacil-ARNt la situsul A al ribozomului. Generează EF-Tu activ.
	EF-T	
	EF-G	Stimulează translocația; este dependentă de GTP.
Terminare	RF1	Catalizează eliberarea lanțului polipeptidic din ARNt și disociază complexul de translocație ; este specifică pentru codonii stop UAA și UAG.
a traducerii și publicării	RF2	Se comportă ca RF1; este specific codonilor UGA și UAA
Polipeptidă	RF3	Stimulează RF1 și RF2

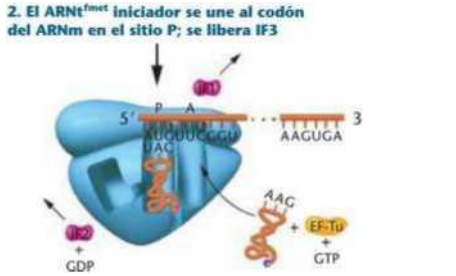




1. El ARNm se une a la subunidad pequeña junto con los factores de Iniciación (IF1, 2, 3)



2. El ARNt^{fmet} iniciador se une al codón del ARNm en el sitio P; se libera IF3



3. La subunidad grande se une al complejo: se liberan IF1 e IF2; EF-Tu se une al ARNt, facilitando su entrada en el sitio

FIGURA 14.6 Iniciación de la traducción. Los componentes se muestran a la izquierda.

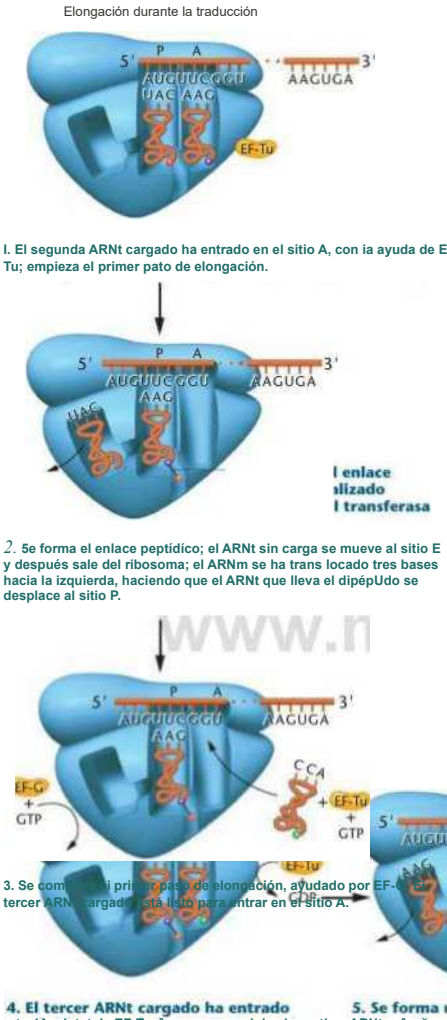
Elongaţie

Figura 14.7 prezintă a doua fază a translației , elongarea. Odată ce cele două subunități ribozomale sunt asamblate cu ARNm, se formează două situsuri de legare pentru moleculele de ARNt încărcate. Acestea sunt denumite situsul P (peptidil) și situsul A (aminoacil). ARNt-ul de inițiere încărcat se leagă de situsul P, cu condiția ca tripletul AUG al ARNm să fie în poziția corectă pe subunitatea mică.

Alungirea lanțului polipeptidic în creștere prin adăugarea unui aminoacid se numește elongație. Secvența celui de-al doilea triplet de ARNm dictează ce moleculă de ARNt încărcată va fi poziționată la situsul A (Pasa 1). Odată prezentă, are loc o reacție enzimatică în subunitatea ribozomală mare, catalizând formarea legăturii peptidice care leagă cei doi aminoacizi. Chiar înainte de aceasta, legătura covalentă dintre ARNt care ocupă situsul P și aminoacidul său partener este hidrolizată (ruptă). Dipeptida nou formată rămâne atașată la capătul ARNt încă la situsul A (Pasa 2). Inițial s-a crezut că aceste reacții sunt catalizate de o enzimă numită peptidil transferază, care a fost integrată în subunitatea ribozomală mare și nu a fost niciodată izolată de aceasta. Cu toate acestea, acum este clar că această activitate catalitică este o funcție a ARNr 235 al subunității mari, probabil în conjuncție cu una sau mai multe proteine ribozomale. În acest caz, așa cum am văzut la scindarea pre-ARNm în Capitolul 13, numim complexul ribozim, pentru a reflecta rolul catalitic pe care ARN-ul îl joacă în acest proces.

Înainte ca elongația să poată fi repetată, ARNt-ul legat de situsul P, care acum este neîncărcat, trebuie eliberat din subunitatea mare. ARNt -ul neîncărcat se deplasează temporar către un al treilea situs de pe ribozom numit situsul E (ieșire) . Apoi, complexul complet ARNm-ARNt- $_{aa^2}$ - $_{aa^1}$ ARNm-ul se deplasează cu o distanță de trei nucleotide către situsul P (Pasa 3). Acest eveniment, numit *translocație,* necesită mai mulți factori de elongație ai proteinelor (FE). Deși inițial se credea că energia derivată din hidroliza GTP era esențială pentru translocație, acum se crede că energia produsă fixează structurile corespunzătoare în timpul etapei de elongație. Drept urmare, al treilea codon al ARNm-ului s-a mutat acum la situsul A și este gata să accepte ARNt-ul său specific încărcat (Pasa 4). O modalitate simplă de a distinge cele două situsuri este să ne amintim că, *după deplasare,* situsul P (P pentru peptidă) conține un ARNt legat de un lanț peptidic, în timp ce situsul A (A pentru aminoacid) conține un ARNt legat de un aminoacid.

Această secvență de alungire și translocație se repetă iar și iar (Pașii 5 și 6). De fiecare dată când



Pe măsură ce ARNm deplasează trei nucleotide de-a lungul ribozomului, încă un aminoacid este adăugat la lanțul polipeptidic în creștere. Când a fost asamblat un lanț polipeptidic de dimensiuni rezonabile (aproximativ 30 de aminoacizi), acesta începe să iasă de la baza subunității mari , așa cum este ilustrat în Pasul 6. Polipeptida în curs de elongare iese printr-un tunel situat în interiorul subunității mari .

După cum am văzut, funcția subunității mici în timpul elongării este de a „decodifica" codonii ARNm, în timp ce funcția subunității mari este sinteza legăturii peptidice. Eficiența procesului este extraordinar de mare: rata de eroare observată este de numai 10^{-11}. Cu această rată de eroare, va exista un aminoacid incorect doar într-unul din 20 de polipeptide care au o lungime medie de 500 de aminoacizi. În E. *coli* , elongarea are loc cu o rată de aproximativ 15 aminoacizi pe secundă la 37 °C.

Terminare

Figura 14.8 prezintă terminarea, a treia fază a translației. Terminarea sintezei proteinelor este semnalată de apariția la situsul A a oricăruia dintre cei trei codoni posibili: UAG, UAA sau UGA. Acești codoni nu specifică niciun aminoacid, deci nu atrag niciun ARNt la situsul A. Aceștia se numesc codoni stop , codoni de terminare sau codoni nonsens. Adesea, într-un ARNm apar mai mulți codoni stop consecutivi. Când se întâlnește unul dintre acești codoni stop, polipeptida terminată este încă legată de ARNt terminal la situsul Ryd; situsul A este gol . Codonul stop declanșează acțiunea unui factor de eliberare dependent de GTP, care stimulează etapele care duc la eliberarea lanțului polipeptidic din ARNt terminal și, ulterior, din complexul ARN-Ryd.

FIGURA 14.7 Alungirea lanțului polipeptidic în creștere în timpul traducerii.

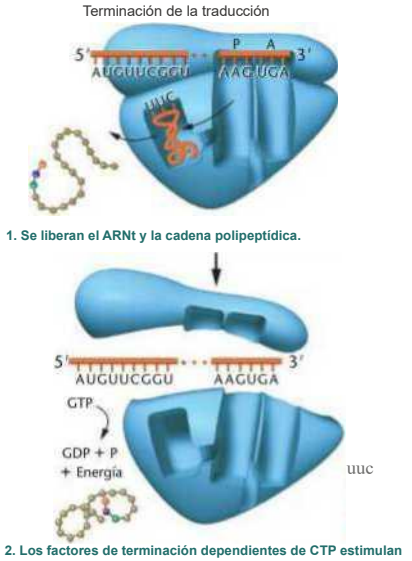


FIGURA 14.8 Încheierea procesului de traducere.

Traducere (etapa 1). Apoi, ARNt este eliberat din ribozom, care se disociază în subunitățile sale (etapa 2). Dacă un codon stop ar apărea în mijlocul unei molecule de ARNm ca urmare a unei mutații, același proces ar avea loc și lanțul polipeptidic ar fi terminat prematur.

Poliribozomi

Pe măsură ce elongarea continuă și porțiunea inițială a ARNm a trecut prin ribozom, această porțiune a ARNm este liberă să se asocieze cu o altă subunitate mică, formând astfel un alt complex de inițiere. Acest proces poate fi repetat de mai multe ori în același ARNm, rezultând ceea ce se numește poliribozom sau, pur și simplu, polisemie .

Poliribozomii pot fi izolați și analizați după o liză celulară ușoară . Fotografiile din Figura 14.9 arată cum arată aceste complexe la microscop electronic . În Figura 14.9 (a), se pot observa liniile fine de ARNm dintre ribozomii individuali. Micrografia din Figura 14.9 (b) este și mai remarcabilă, deoarece prezintă lanțurile polipeptidice care ies din ribozomi în timpul translației. Formarea complexelor polizomale reprezintă o utilizare eficientă a componentelor disponibile pentru sinteza proteinelor la un moment dat . Dacă facem o analogie cu casetofoanele, ceea ce am face în complexele polizomale este să redăm o singură casetă (ARNm) simultan pe mai multe casetofone (ribozomii). În orice moment dat, fiecare casetofon ar reda o parte diferită a melodiei (polipeptida fiind sintetizată pe fiecare ribozom).

Studiile de înaltă rezoluție au dezvăluit multe detalii despre ribozomii procarioți funcționali

14.3

Înțelegerea noastră asupra procesului de translație și a structurii ribozomale, așa cum este

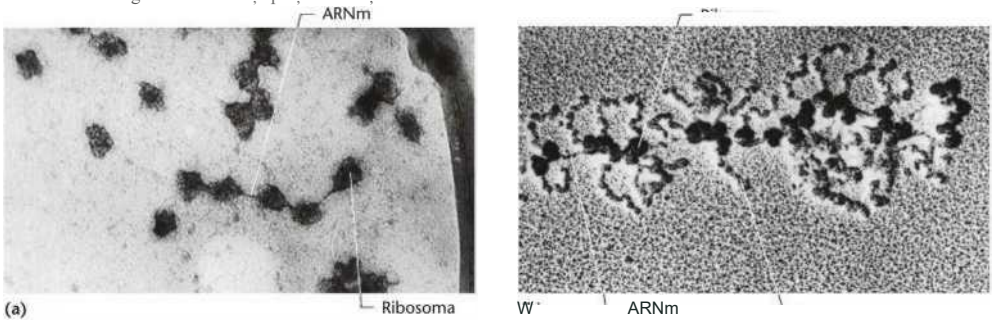


FIGURA 14.9 Polirribosomas vistos con el microscopio electrónico, (a) Ejemplos de reticulocitos de conejo ocupados en la traducción del ARNm de la hemoglobina, (b) Ejemplos de células de glándulas salivares de la mosca de agua *Chironomus thummi.* Observe que pueden verse las cadenas polipeptídicas nacientes que van emergiendo de cada ribosoma. Su longitud se incrementa al avanzar la traducción de izquierda a derecha a lo largo del ARNm.

descrisă în secțiunile precedente , se bazează în principal pe observații biochimice și genetice , precum și pe vizualizarea ribozomilor la microscop electronic. Pentru a confirma și rafina aceste informații, următorul pas este examinarea ribozomului la rezoluții și mai mari. De exemplu, o modalitate de a realiza acest lucru este prin analizarea cristalelor ribozomale folosind difracția de raze X. Cu toate acestea , din cauza dimensiunii enorme și a complexității interacțiunilor moleculare care au loc în ribozomii activi și funcționali, obținerea cristalelor necesare pentru studiile de difracție de raze X a fost extrem de dificilă. Cu toate acestea, în ultimul deceniu s-au înregistrat progrese semnificative . Mai întâi, subunitățile ribozomale individuale au fost cristalizate și analizate în mai multe laboratoare, în special în laboratorul lui V. Ramakrishnan. Apoi, Harry Noller și colegii săi au examinat structura cristalină a ribozomului 70S intact, complet, cu ARNm și ARNt asociate. În esență, întregul complex de translație putea fi observat la nivel atomic. Atât Ramakrishnan, cât și Noller au obținut ribozomii de la bacteria *Thermits thermophilus.*

Aceste investigații au produs numeroase observații demne de remarcat . De exemplu, dimensiunile și formele subunităților, măsurate în dimensiuni atomice , sunt în concordanță cu estimările anterioare bazate pe microscopia electronică de înaltă rezoluție. În plus, forma ribozomilor se modifică în diferite stări funcționale , evidențiind natura dinamică a procesului de translație. De asemenea, s-au învățat multe despre importanța și localizarea componentelor ARN ale subunităților . De exemplu, aproximativ o treime din ARN-ul 16S este responsabil pentru producerea unei proiecții plate, numită *platformă,* în interiorul micii subunități 308 și modulează mișcarea complexului ARNm -ARNt în timpul translocării. Unul dintre modelele bazate pe descoperirile lui Noller este prezentat în fotografia de deschidere a acestui capitol.

Analiza cristalografică susține, de asemenea, conceptul că ARN-ul este principalul „actor" în timpul traducerii. Interfața dintre cele două subunități, considerată locul de pe ribozom unde are loc polimerizarea aminoacizilor , este compusă aproape exclusiv din ARN . În schimb , numeroasele proteine ribozomale sunt situate în mare parte la periferia ribozomului. Aceste observații confirmă ceea ce a fost prezis pe baza dovezilor genetice : că etapele catalitice care unesc aminoacizii în timpul traducerii au loc sub conducerea ARN-ului, nu a proteinelor .

O altă descoperire interesantă este locația reală a mai multor - situsuri prezise pentru legarea ARNt în timpul translației . Cele trei situsuri (A, P și E) au fost identificate folosind studii de difracție cu raze X și, în fiecare caz, ARN-ul ribozomal intră în contact direct cu diferitele bucle și domenii ale moleculei de ARNt . Această observație susține ipoteza privind rolurile diferitelor regiuni ale ARNt și ne ajută să înțelegem de ce conformația tridimensională distinctivă care caracterizează toate moleculele de ARNt a fost păstrată de-a lungul istoriei evolutive .

O altă observație relevantă este că situsurile A, P și E sunt separate de cel puțin 20 Å și poate chiar 50 Å, ceea ce definește distanța atomică pe care moleculele de ARNt trebuie să o parcurgă în fiecare eveniment de translocație . Această distanță este considerată destul de mare în comparație cu dimensiunea ARNt-urilor în sine. Analize ulterioare au condus la identificarea unor punți moleculare (ARN-proteină) între cele trei situsuri, care par a fi implicate în evenimentele de translocație . Punți similare există și în alte situsuri cheie care au fost legate de funcția ribozomilor . Aceste observații ne oferă o imagine mai completă a schimbărilor dinamice care trebuie să aibă loc în interiorul ribozomului în timpul translației. O ultimă observație ne duce înapoi cu 50 de ani, când Francis Crick a propus ipoteza oscilației, care a fost prezentată în Capitolul 13. Grupul lui Ramakrishnan a identificat locația precisă în ARNr 168 a subunității 308 implicată în etapa de decodificare care conectează ARNm la ARNt -ul corespunzător. În această locație, două nucleotide specifice ale ARNr 168 se îndoaie și sondează regiunea codon-codont și se crede că verifică acuratețea împerecherii bazelor în timpul acestei interacțiuni. Conform ipotezei oscilației , această verificare este foarte strictă pentru primele două perechi de baze, dar mai puțin strictă pentru a treia pereche de baze (perechea oscilație).

Pe măsură ce înțelegerea noastră asupra procesului de translație la procariote a crescut , un studiu remarcabil realizat de Niels Ficher și colegii săi a fost publicat în 2010. Folosind o tehnică originală de înaltă rezoluție - microscopia crioelectronică cu o singură particulă rezolvată în timp (cryo-EM) - a fost capturat și examinat ribozomul 70S al *E. coli* . În timpul procesului de translație , cu o rezoluție de 5,5 Å, în timpul acestei lucrări , au fost obținute și analizate computerizat peste două milioane de imagini , stabilind o imagine temporală a traiectoriilor ARNt în timpul procesului de translocație. Echipa de cercetare a examinat modul în care ARNt se translocă în timpul alungirii lanțului polipeptidic . Aceștia au demonstrat că aceste traiectorii sunt cuplate cu modificări conformaționale dinamice ale componentelor ribozomilor . În mod surprinzător, acest studiu a relevat faptul că, în timpul translației , ribozomul se comportă ca o mașină moleculară complexă , *alimentată de mișcarea browniană acționată de energia termică.* Cu alte cuvinte, necesarul de energie pentru a realiza diversele modificări conformaționale esențiale pentru translocație este inerent ribozomului în sine.

Multe întrebări despre structura și funcția ribozomilor rămân fără răspuns. În special, funcția multor proteine ribozomale trebuie încă clarificată. Cu toate acestea, modelele care încep să apară pe baza cercetărilor lui Noller, Ramakrishnan, Fisher și a numeroșilor lor colegi ne oferă o înțelegere mult mai bună a mecanismului de traducere.

14.4

Traducerea este mai complexă la eucariote

Caracteristicile generale ale modelului pe care tocmai l-am prezentat provin din cercetările privind traducerea la bacterii. După cum tocmai am văzut (Figura 14.1), una dintre principalele diferențe dintre traducerea la procariote și eucariote este că, în acestea din urmă, traducerea are loc în ribozomi mai mari, ale căror componente ARNr și proteice sunt mai complexe. Interesant este că ARNr-urile procariote și eucariote au în comun ceea ce se numește secvența *fundamentală.* Însă la eucariote, ARN-urile ribonucleice sunt alungite prin adăugarea de *secvențe de expansiune* (ES *),* care probabil oferă funcționalitate suplimentară . *O altă* diferență importantă este că , în timp ce la procariote transcripția și traducerea sunt asociate, la eucariote aceste două procese sunt separate temporal și spațial . În celulele eucariote, transcripția are loc în nucleu , iar traducerea în citoplasmă. Această separare oferă celulelor eucariote multiple oportunități de a regla expresia genelor.

Mai multe aspecte ale inițierii translației variază la eucariote. Trei diferențe se concentrează pe ARNm-ul care este tradus . În primul rând, capătul 5' al ARNm dezvoltă o calotă la maturare, constând dintr *-un reziduu de* 7 - metilguanozină (7-mG); vezi *Capitolul* 13. Prezența acestei calote, absentă la organismele procariote, este esențială pentru inițierea eficientă a translației . O a doua diferență este că multe ARNm conțin o purină (A sau G) cu trei baze în amonte de codonul de start AUG, care este urmată de o G (A/G NNAUGG). Numită după descoperitoarea sa, Marilyn Kozak, se crede că această secvență la eucariote crește eficiența translației prin interacțiunea cu ARNm -ul inițiator . Această secvență Kozak este considerată analoagă cu *secvența Shine-Dalgarno* găsită în regiunea din amonte a ARNm-urilor procariote.

În al treilea rând, ARNm-urile eucariote necesită adăugarea post-transcripțională a unei cozi poli-A la capătul 3'; adică sunt *poliadenilate.* În absența poli -A, aceste mesaje potențiale sunt degradate rapid în citoplasmă . Interesant este că ARNm-urile histonei sunt o excepție și nu sunt poliadenilate. O altă diferență legată de inițierea translației este că eucariotele nu necesită aminoacidul formilmetionină , așa cum o fac procariotele . Cu toate acestea, tripletul AUG, care codifică metionina, este esențial pentru formarea complexului $^{\text{de translație , iar}}$ în timpul inițierii se $_{\text{utilizează}}$ un ARN de transfer special ($^{\text{tRNA1M't}}$) .

Există și alte diferențe importante. ARNm-ul eucariot are o durată de viață mai lungă decât omologul său procariot. Majoritatea există timp de ore, mai degrabă decât de minute, înainte de a fi degradate de nucleazele celulare, rămânând disponibile mult mai mult timp pentru sinteza proteinelor orchestrată. Și, în timpul traducerii , factorii proteici similari cu cei din organismele procariote direcționează inițierea, alungirea și terminarea traducerii la eucariote . Mulți dintre acești factori eucarioți sunt în mod clar omologi cu omologii lor procarioți. Cu toate acestea, un număr mai mare de factori este în general necesar la fiecare dintre aceste etape, iar unii sunt mai complecși decât la organismele procariote. În cele din urmă, rețineți că la eucariote , mulți, deși nu toți, ribozomii celulari sunt asociați cu membranele care formează reticulul endoplasmatic [formând ceea ce se numește reticulul endoplasmatic rugos (RE)]. Aceste membrane lipsesc din citoplasma celulelor procariote. Această asociere la eucariote facilitează secreția proteinelor nou sintetizate din ribozomi direct în canalele reticulului endoplasmatic . Studii recente care utilizează criomicroscopia electronică au elucidat modul în care se întâmplă acest lucru. În subunitatea ribozomală mare, există un *tunel* care începe în apropierea interfeței dintre cele două subunități și se termină în apropierea părții din spate a subunității mari . Se crede că amplasarea acestui tunel în cadrul subunității mari oferă conductul pentru ca lanțul polipeptidic nou sintetizat să iasă din ribozom. În studiile efectuate pe drojdie, polipeptidele nou sintetizate intră în RE printr -un canal membranar format de o proteină specifică, Secol. Acest canal este perfect aliniat cu punctul de ieșire al tunelului ribozomal. La procariote, ribozomul eliberează polipeptide direct în citoplasmă.

Încheiem această secțiune menționând că, la sfârșitul anului 2010, după ani de muncă, Marat Yusupov și colegii săi au reușit să vizualizeze structura cristalină a ribozomului eucariot 80S, extrem de complex, cu o rezoluție remarcabilă de 4,15 Å. Această cercetare, care se concentrează pe ribozomul de drojdie , începe să dezvăluie la nivel atomic câte aspecte ale translației specifice eucariotelor au loc . De exemplu, s-a

stabilit că, pe măsură ce ARNm se deplasează cu trei nucleotide în timpul translației (procesul de translocație), subunitatea mică se rotește cu 4°-5° în sensul acelor de ceasornic. Așa cum era de așteptat, translația este într-adevăr un proces dinamic, deoarece subunitățile se deplasează una față de cealaltă pe măsură ce ARNm trece prin ribozom. Analizele ulterioare cu această rezoluție vor oferi, fără îndoială, mult mai multe informații despre interacțiunile ARNm și ARNt cu componentele ribozomilor și, prin urmare, o mai bună înțelegere a procesului la eucariote.

14,5

Ideea inițială că proteinele sunt importante pentru ereditate a provenit din studiul erorilor metabolice congenitale

Vom analiza acum cum știm că proteinele sunt produsul final al expresiei genelor. Prima perspectivă asupra rolului proteinelor în procesele genetice a provenit din observațiile făcute de Sir Archibald Garrod și William Bateson la începutul secolului al XX-lea . Garrod provenea dintr-o familie engleză de oameni de știință. Tatăl său era un medic profund interesat de baza chimică a artritei reumatoide, iar fratele său mai mare era un eminent zoolog londonez . Nu este surprinzător , așadar, că, în calitate de medic practicant, Garrod era interesat de diverse boli umane care păreau a fi ereditare. Deși a studiat și albinismul și cistinuria, vom descrie aici investigațiile sale asupra bolii alcaptonurie. Persoanele afectate de această boală au o cale metabolică importantă blocată (Figura 14.10). Drept urmare , ele nu pot metaboliza alcaptonul, acidul 2,5-dihidroxifenilacetic, cunoscut și sub numele de acid homogentisic . Acidul homogentisic se acumulează în celule și țesuturi și este excretat în urină . Produșii de oxidare ai acestei molecule sunt negri și ușor de detectat în scutecele nou-născuților. Produșii nemetabolizați tind să se acumuleze în zonele cartilaginoase, provocând înnegrirea urechilor și a nasului . În articulații , aceste depozite duc la o afecțiune benignă asemănătoare artritei . Alcaptonuria este rară și nu este gravă, dar persistă pe tot parcursul vieții unei persoane.

Garrod a studiat alcaptonuria , căutând modele de moștenire a acestei trăsături benigne . În cele din urmă, a concluzionat că aceasta are o bază genetică. Din 32 de cazuri cunoscute, a descoperit că 19 aparțineau la șapte familii, o familie având patru frați afectați. În mai multe cazuri, părinții nu erau afectați , dar se știa că erau veri primari și, prin urmare , consangvini,

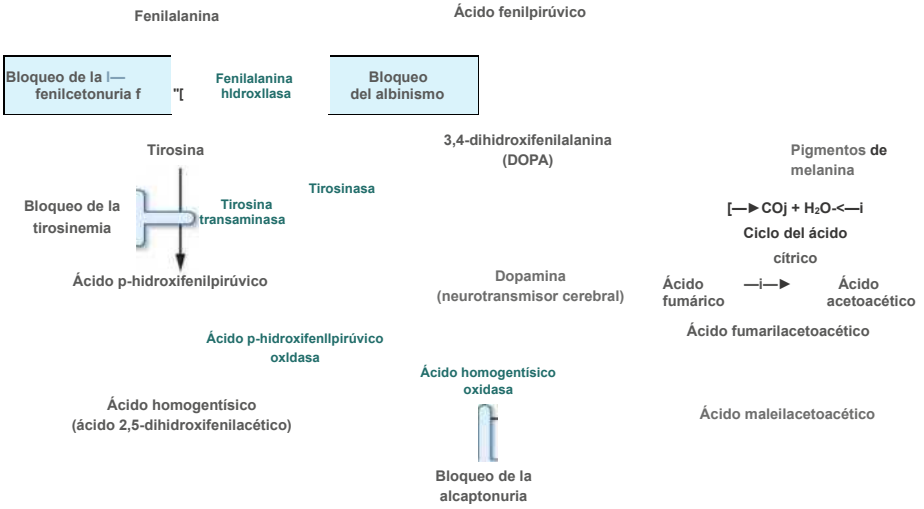


FIGURA 14.10 Ruta metabólica en la que participan la fenilalanina y la tirosina. Diferentes bloqueos metabólicos como consecuencia de mutaciones provocan las enfermedades de la fenilcetonuria, la alcaptonuria, el albinismo y la tirosinemia.

un termen care descrie rudele care au un strămoș comun recent. Părinții care sunt astfel înrudiți sunt mai predispuși decât părinții neînrudiți să aibă copii care exprimă trăsături recesive , deoarece acești părinți sunt mai predispuși să fie heterozigoți pentru unele dintre aceleași trăsături recesive *(vezi* Capitolul 25). Garrod a concluzionat că această tulburare moștenită a rezultat dintr -un mod alternativ de metabolism, ceea ce implică faptul că informațiile ereditare controlează reacțiile chimice din organism. Deoarece termenii *genă* și *enzimă nu* erau comuni pe vremea lui Garrod, acesta a folosit conceptele corespunzătoare de *factori* și *fermenti.* Garrod și-a publicat observațiile inițiale în 1902.

Doar câțiva geneticieni, inclusiv Bateson, cunoșteau sau făceau referire la experimentele lui Garrod. Ideile lui Garrod se potriveau bine cu convingerea lui Bateson că tulburările ereditare erau cauzate de deficiența unei substanțe esențiale. În 1909, Bateson a publicat *„Principiile eredității" ale lui Mendel,* în care a făcut o legătură între enzime și ereditate. Cu toate acestea , timp de aproape 30 de ani, majoritatea geneticienilor nu au reușit să vadă relațiile dintre gene și enzime. Garrod și Bateson, la fel ca Mendel, au fost înaintea timpului lor.

Fenilcetonurie

Fenilcetonuria (PKU) este o tulburare metabolică ereditară la om, care apare atunci când una dintre reacțiile din calea prezentată în Figura 14.10 este blocată . Descrisă inițial în 1934, această tulburare poate provoca dizabilități intelectuale și este moștenită ca o afecțiune autosomal recesivă. Persoanele afectate nu pot converti aminoacidul fenilalanină în aminoacidul tirozină. Aceste molecule diferă printr-o singură grupare hidroxil (OH), care se găsește în tirozină, dar nu și în fenilalanină. Reacția este catalizată de enzima fenilalanină hidroxilază , care este inactivă la persoanele afectate și activă la aproximativ 30% dintre heterozigoți . Această enzimă este localizată în ficat. În timp ce nivelul normal de fenilalanină din sânge este de aproximativ 1 mg/100 ml, persoanele cu PKU au niveluri de până la 50 mg/100 ml.

fenilalanina se acumulează , aceasta poate fi transformată în acid fenilpiruvic și ulterior în alți derivați. Aceștia sunt reabsorbiți de rinichi mult mai puțin eficient și tind să fie excretați în urină mai rapid decât fenilalanina. Atât fenilalanina, cât și derivații săi pătrund în lichidul cefalorahidian, ducând la niveluri crescute în creier . Se crede că prezența acestor substanțe în timpul dezvoltării timpurii provoacă dizabilități intelectuale.

Fenilcetonuria (PKU) apare la aproximativ 1 din 11.000 de nașteri, iar în Statele Unite, nou-născuții sunt testați în mod curent pentru PKU. Atunci când această tulburare este detectată în analiza de sânge a unui copil , se instituie un regim alimentar strict. O dietă cu conținut scăzut de fenilalanină poate reduce produșii secundari , cum ar fi acidul fenilpiruvic, diminuând astfel anomaliile care caracterizează boala.

Înțelegerea bolilor metabolice ereditare , cum ar fi alcaptonuria și fenilcetonuria, a revoluționat gândirea și practica medicală . Bolile umane, despre care se credea odinioară că se datorează exclusiv - acțiunii microorganismelor, virusurilor sau paraziților invadatori , sunt acum înțelese clar ca având o bază genetică. În prezent, știm că sute de anomalii fiziologice sunt cauzate de erori metabolice rezultate din gene mutate. Bolile biochimice umane implică toate tipurile de biomolecule organice.

14.6 Studiile efectuate pe *Neurospora* au condus la ipoteza o genă-o enzimă

În două investigații separate, inițiate în 1933, George Beadle a furnizat primele dovezi experimentale convingătoare că genele sunt direct responsabile de sinteza enzimelor . Prima investigație, realizată în colaborare cu Boris Ephrussi, a implicat pigmenții oculari ai *musculiței Drosophila. Beadle și Ephrussi au confirmat că genele mutante care modifică* culoarea ochilor la muscula de fructe ar putea fi legate de erori biochimice care, cel mai probabil, implicau o pierdere a funcției enzimatice . Încurajat de aceste descoperiri, Beadle a colaborat apoi cu Edward Tatum pentru a investiga mutațiile nutriționale la mucegaiul roz de pâine, *Neurospora crassa.* Această cercetare a condus la ipoteza unei enzime gemuna.

Analiza lui Beadle și Tatum asupra mutanților *Neurospora*

începutul anilor 1940 , Beadle și Tatum au ales să lucreze cu *Neurospora* deoarece se știau multe despre biochimia sa și era relativ simplu să se inducă și să se izoleze mutații. Prin inducerea mutațiilor, au obținut tulpini care aveau blocaje genetice în reacții esențiale pentru creșterea organismului .

Beadle și Tatum știau că această mucegai putea produce aproape toate biomoleculele necesare dezvoltării sale normale . De exemplu, folosind surse de bază de carbon și azot, acest organism poate sintetiza nouă vitamine solubile în apă , 20 de aminoacizi, diverși pigmenți caroteni și toate purinele și pirimidinele esențiale. Beadle și Tatum au iradiat conidii (spori) asexuate cu raze X pentru a crește rata de mutație și

le-au permis să crească într-un mediu „complet” care conținea toți factorii necesari creșterii lor (vitamine, aminoacizi etc.). În aceste condiții de creștere, o tulpină mutantă care nu putea crește în mediu minimal putea crește datorită suplimentelor prezente în acest mediu complet îmbogățit. Toate culturile au fost apoi transferate în mediu minimal. Dacă creșterea avea loc în mediu minimal, însemna că organismele puteau sintetiza toți factorii necesari creșterii lor, iar cercetătorii puteau concluziona că culturile din care proveneau aceste organisme nu conțineau nicio mutație nutrițională. Dacă nu creșteau, atunci se concluziona că cultura care nu reușise să crească conținea o mutație nutrițională. Următoarea sarcină a fost determinarea tipului de mutație nutrițională. Rezultatele sunt prezentate în Figura 14.1 1(a) .

Folosind această procedură, mii de spori au fost izolați și crescuți în mediu complet. În studiile ulterioare în mediu minimal, multe culturi nu au reușit să crească, indicând faptul că a avut loc o mutație nutrițională. Pentru a identifica tipul de mutație, tulpinile mutante au fost menținute într-o serie de medii incomplete diferite [Figura 14.1 1(b) și (c)], fiecare conținând grupuri diferite de suplimente și, ulterior, în medii care conțineau doar una dintre vitamine, aminoacizi,

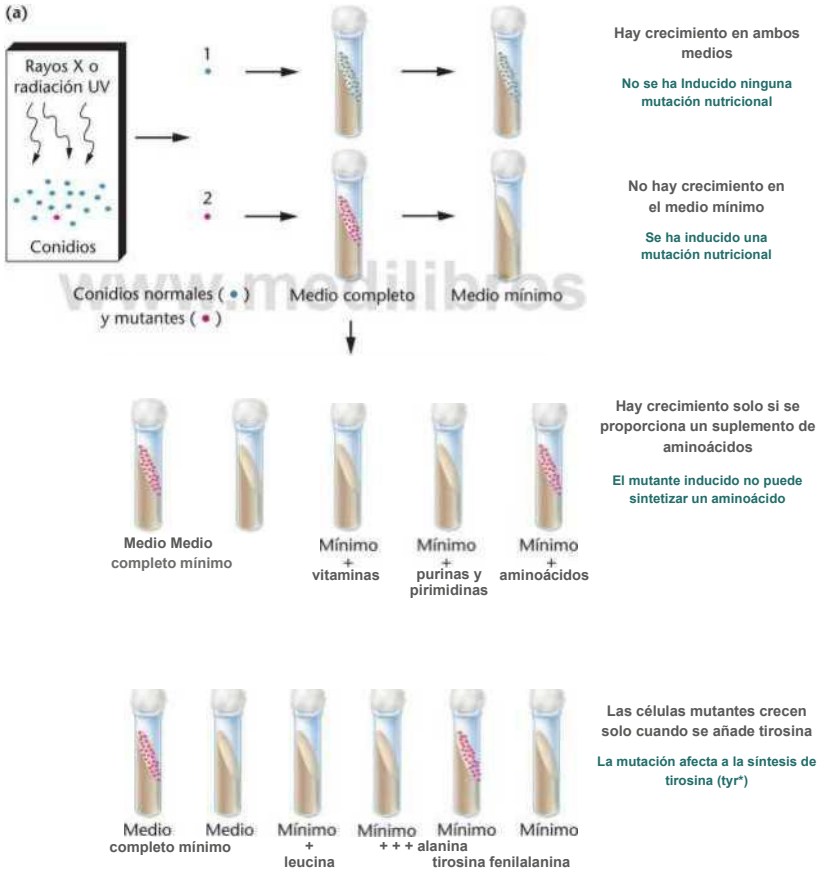

(a)
Rayos X o radiación UV
Conidios
1
2
Conidios normales (•) y mutantes (•)
Medio completo
Medio mínimo
Hay crecimiento en ambos medios
No se ha inducido ninguna mutación nutricional
No hay crecimiento en el medio mínimo
Se ha inducido una mutación nutricional
Medio completo
Medio mínimo
Mínimo + vitaminas
Mínimo + purinas y pirimidinas
Mínimo + aminoácidos
Hay crecimiento solo si se proporciona un suplemento de aminoácidos
El mutante inducido no puede sintetizar un aminoácido
Medio completo
Medio mínimo
Mínimo + leucina
Mínimo + + + alanina
Mínimo tirosina
Mínimo fenilalanina
Las células mutantes crecen solo cuando se añade tirosina
La mutación afecta a la síntesis de tirosina (tyr⁻)

FIGURA 14.11 Inducción, aislamiento y caracterización de una mutación nutricional auxotrófica en *Neurospora*, (a) La mayoría de los conidios no están afectados (azul), excepto un conidio (en color rojo) que contiene una mutación (b y c). Se estableció la naturaleza precisa de la mutación y se determinó que está implicada en la biosíntesis de la tirosina.

purine sau pirimidine, până când a fost găsit suplimentul specific care a restabilit creșterea. Beadle și Tatum au argumentat că suplimentul care a restabilit creșterea era molecula pe care tulpina mutantă nu a putut să o sintetizeze.

Prima tulpină mutantă izolată a necesitat vitamina B6 (piridoxină) în mediul de creștere, iar a doua a necesitat vitamina B1 (tiamină). Folosind aceeași procedură, Beadle și Tatum au izolat și studiat sute de mutanți cu deficit de sinteză a altor vitamine, aminoacizi, nucleotide sau alte substanțe.

Rezultatele testării a peste 80.000 de spori i-au convins pe Beadle și Tatum că genetica și biochimia au multe în comun. Părea probabil că fiecare mutație nutrițională a cauzat pierderea unei activități enzimatice care facilitează o reacție esențială la organismele de tip sălbatic. De asemenea, se părea că o mutație putea fi găsită pentru aproape fiecare reacție controlată de enzime. Astfel, Beadle și Tatum au furnizat dovezi experimentale convingătoare pentru ipoteza că o *genă specifică o enzimă,* o idee la care Garrod și Bateson făcuseră aluzie cu 30 de ani mai devreme. Cu unele modificări , acest concept a devenit un alt principiu principal al geneticii .

Genele și enzimele: analiza căilor biochimice

Conceptul „ o genă - o enzimă" și metodele sale însoțitoare au fost utilizate timp de mulți ani pentru a rezolva multe detalii ale metabolismului Neurospora *, Escherichia coli* și al diferitelor alte microorganisme. Una dintre primele căi metabolice investigate în detaliu a fost cea care a condus la sinteza aminoacidului arginină în *Neurospora.* Studiind șapte tulpini mutante, toate necesitând arginină pentru a crește *(arg),* Adrian Srb și Norman Horowitz au reușit să determine calea biochimică parțială care a condus la sinteza acestui aminoacid. Munca lor demonstrează modul în care analiza genetică poate fi utilizată pentru a obține informații biochimice.

Srb și Horowitz au testat capacitatea fiecărei tulpini mutante de a restabili creșterea atunci când citrulina sau ornitina, doi compuși chimic foarte similari cu arginina, au fost utilizați ca supliment la mediul minimal. Ei au argumentat că, dacă oricare dintre ele putea înlocui arginina, trebuie să fie implicată în calea biosintezei argininei. Cercetătorii au stabilit că ambele molecule puteau fi substituite într-una sau mai multe tulpini.

Dintre cele șapte tulpini mutante, patru *(arg 4* Tulpinile arg 7 au crescut indiferent dacă au fost alimentate cu citrulină, ornitină sau arginină. Două dintre ele *(arg 2* și *arg* 3) au crescut fie cu citrulină , fie cu arginină . O tulpină *(arg 1)* a crescut doar cu arginină; nici citrulina, nici ornitina nu au putut să o înlocuiască. Din aceste observații experimentale, au dedus următoarea cale metabolică și blocajele metabolice rezultate:

<wjf4-7 J arg i
Precursor ------- » Ornitina -------» Citrulina --------* Arginina
Enzima A Enzima B Enzima ('

Raționamentul care susține aceste concluzii se bazează pe următoarele : dacă mutanții *arg 4* până la *arg 7* Acestea pot crește indiferent de care dintre aceste trei molecule este furnizată ca supliment la mediul minimal ; mutațiile care nu permit creșterea trebuie să provoace un bloc metabolic *prealabil* . la participarea ornitinei, citrulinei sau argininei în calea metabolică . Când se adaugă oricare dintre aceste trei molecule , prezența sa depășește blocajul . *Prin* urmare , *se* poate concluziona că atât citrulina , cât și ornitina sunt implicate în biosinteza argininei . Cu toate acestea , cu aceste date , nu se poate determina secvența participării lor la cale .

Pe de altă parte, mutanții *arg2 și arg3* cresc atunci când *li* se administrează citrulină , dar nu și atunci când *li* se administrează doar ornitină . Prin urmare, ornitina trebuie să fie implicată în calea metabolică *înainte de blocaj.* Prezența sa nu va depăși blocada metabolică . Citrulina , însă , *depășește blocada* . Prin urmare , trebuie să fie implicată dincolo de acest punct . Astfel , conversia ornitinei în citrulină reprezintă secvența corectă a căii metabolice .

În final, se poate concluziona că arg1 *reprezintă* o mutație care previne *conversia* citrulinei în arginină. Nici ornitina , nici citrulina nu pot depăși blocajul metabolic la nivelul acestei mutații , deoarece ambele participă la etape timpurii ale căii metabolice.

Luate împreună, această analiză susține secvența biosintetică prezentată în Figura 14.12. De la experimentele lui Srb și Horowitz, efectuate în 1944, a fost descrisă calea metabolică detaliată , iar enzimele care controlează fiecare etapă au fost caracterizate .

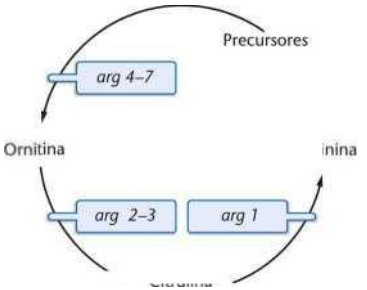


FIGURA 14.12 Rezumatul căii care descrie biosinteza argininei la *Neurospora.*

ACUM REZOLVĂ ASTA

14.2 O serie de mutații la bacteria *Salmonella typhimurium* Acestea necesită triptofan sau o moleculă înrudită pentru a se produce creșterea. Pe baza datelor prezentate mai jos, sugerați o cale biosintetică pentru triptofan.

	Supliment de creștere			
	Mediu cu acid minimal antranilic			
trp-8 trp-2 trp-3 trp-1		Indol glicerol fosfato		Indol Triptófano
Mutación				
+	+	+	+	
−	+	+	+	
−	−	+	+	
−	−	−	+	

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm anumite date pentru a stabili o cale biochimică la bacteria Salmonella. Cheia rezolvării acesteia constă în înțelegerea principiilor și aplicarea aceleiași tehnici utilizate pentru descifrarea căilor biochimice la Neurospora.*

14,7

Studiile asupra hemoglobinei umane au stabilit că o genă codifică un singur polipeptid

Nu toți geneticienii au acceptat imediat conceptul de „o genă-o enzimă", dezvoltat la începutul anilor 1940. Acest lucru nu este surprinzător, deoarece încă nu era clar cum enzimele mutante puteau provoca atât de multe variații ale trăsăturilor fenotipice. De exemplu, mutanții *Drosophila* au prezentat modificări ale - dimensiunii ochilor, formei aripilor, modelului nervurilor aripilor și așa mai departe. Plantele au prezentat variații mutante în textura semințelor , înălțimea și dimensiunea fructelor. Pentru mulți geneticieni a fost derutant cum o enzimă mutantă latentă putea produce astfel de fenotipuri.

Doi factori au modificat curând ipoteza enzimei cu o singură gemună. În primul rând, deși *aproape toate enzimele sunt proteine, nu toate proteinele sunt enzime.* Pe măsură ce studiile în genetică biochimică au continuat, a devenit clar că toate proteinele sunt specificate prin informații stocate în gene, ceea ce a dus la terminologia mai precisă a ipotezei proteinei cu o singură gemună. În al doilea rând, s-a demonstrat adesea că proteinele au o structură subunitară formată din două sau mai multe lanțuri polipeptidice. Aceasta este baza structurii cuaternare a proteinelor, care va fi discutată mai târziu în acest capitol. Deoarece fiecare lanț polipeptidic diferit este codificat de o genă diferită, o afirmație mai modernă a principiului de bază al lui Beadle și Tatum este ipoteza lanțului polipeptidic cu o singură gemună. Aceste modificări ale ipotezei inițiale au devenit evidente în timpul analizei structurii hemoglobinei la persoanele cu anemie falciformă.

Anemia falciformă

Primele dovezi directe că genele specifică alte proteine decât enzimele au provenit din experimente cu molecule mutante de hemoglobină de la oameni cu anemie falciformă . Persoanele afectate au globule roșii care, sub o tensiune scăzută de oxigen, devin curbate și alungite din cauza polimerizării hemoglobinei. Forma falciformă a acestor globule roșii contrastează cu forma de disc biconcav caracteristică indivizilor normali (Figura 14.13). Persoanele cu această boală experimentează atacuri atunci când globulele roșii se agregă pe partea venoasă a sistemului capilar, unde tensiunea oxigenului este foarte scăzută. În consecință , diverse țesuturi pot fi lipsite de oxigen și pot suferi leziuni semnificative. Când se întâmplă acest lucru, se spune că individul are o *criză falciformă.* Dacă nu este tratată, criza poate fi fatală. Rinichii, mușchii , articulațiile , creierul , tractul gastrointestinal și plămânii pot fi afectați .

Pe lângă faptul că trec prin crize, acești indivizi sunt anemici deoarece eritrocitele lor sunt distruse mai rapid decât globulele roșii normale. Mecanismele fiziologice compensatorii determină o creștere a producției de globule roșii de către măduva osoasă și o creștere a volumului de muncă cardiac. Aceste mecanisme duc la dimensiuni și forme anormale ale oaselor și la o inimă mărită.

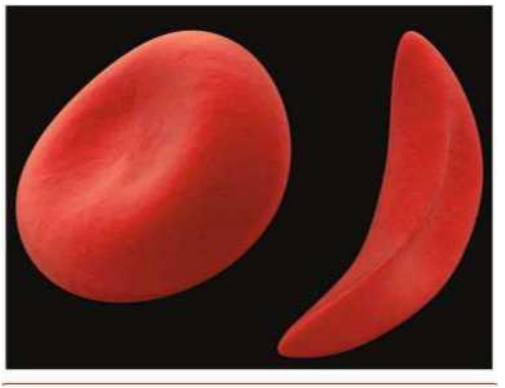


FIGURA 14.13 Comparație între un eritrocit normal (stânga) și un eritrocit de la un pacient cu anemie falciformă (dreapta).

În 1949, James Neel și E. A. Beet au demonstrat că anemia falciformă este moștenită ca o trăsătură mendeliană. Analiza genealogică a relevat prezența a trei genotipuri și trei fenotipuri controlate de o pereche de alele, *Hb* * și *Hbs* · Indivizii normali și cei afectați rezultă din genotipurile homozigote *Hb*/Hb** și *respectiv Hbs /Hbs* · Celulele roșii ale indivizilor heterozigoți, care prezintă trăsătura de anemie falciformă , dar nu și boala, *prezintă* un fenotip în formă de seceră mult mai puțin pronunțat, deoarece mai mult de jumătate din hemoglobina lor este normală. Deși nu sunt practic afectați de boală, indivizii heterozigoți sunt purtători ai genei defecte, pe care o transmit, în medie, la 50% dintre urmașii lor.

În același an, Linus Pauling și colegii săi au oferit prima perspectivă asupra bazei moleculare a anemiei falciforme . Aceștia au demonstrat că hemoglobinele izolate de la indivizii normali și cei afectați diferă în ceea ce privește ratele de migrare electroforetică . În electroforeză (descrisă în Capitolul 10), moleculele încărcate migrează într-un câmp electric. Dacă sarcina netă a două molecule este diferită, ratele lor de migrare vor fi diferite. Astfel, Pauling și colegii săi au concluzionat că există o diferență biochimică între - hemoglobina normală și cea falciformă . Aceste două molecule sunt acum numite HbA și , respectiv , HbS .

Figura 14.14(a) ilustrează modelul de migrare a hemoglobinei de la indivizi cu cele trei genotipuri posibile, așa cum se arată prin electroforeza pe gel de amidon . Gelul oferă mediul de suport pentru molecule în timpul migrării. În acest experiment, probele au fost plasate într-un punct sursă situat între catod (-) și anod (+) și s-a aplicat un curent electric . Modelul de migrare a relevat că toate moleculele s-au deplasat spre anod, indicând faptul că posedă o sarcină negativă netă . Cu toate acestea, HbA a migrat mai repede decât HbS, sugerând că sarcina sa negativă netă a fost mai mare. Modelul de electroforeză a hemoglobinei de la indivizi purtători relevă prezența atât a HbA, cât și a HbS, confirmând astfel genotipul lor heterozigot.

Descoperirile lui Pauling au sugerat două posibilități . Se știa că hemoglobina este alcătuită din patru *grupări hemice* . componente neproteice care conțin fier și o *componentă*

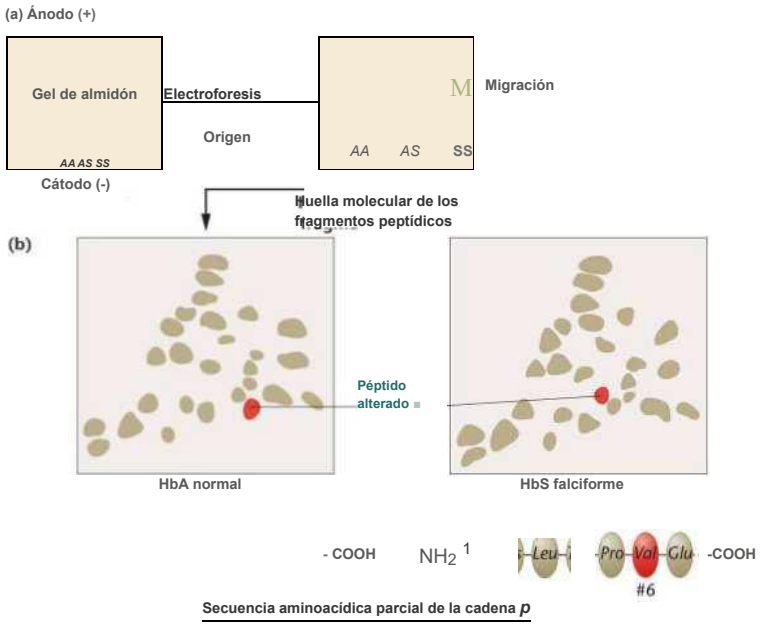


FIGURA 14.14 Investigación de la hemoglobina de individuos Hb^AHb^A, Hb^AHb^S y Hb^SHb^S mediante técnicas electrofo réti cas, de huella molecular y de análisis de aminoácidos. La hemoglobina de los individuos con anemia falciforme *(Hb^SHb^S):* (a) presenta diferente migración en un campo electroforético (b), muestra un péptido alterado en el análisis de la huella molecular y (c) tiene un aminoácido alterado, una valina en la sexta posición de la cadena *ji.* En la electroforesis, los individuos heterocigóticos *(Hb^AHb^S)* presentan ambas formas de hemoglobina.

globinică alcătuită din patru lanțuri polipeptidice. În teorie , modificarea sarcinii nete a HbS ar putea fi datorată unei modificări chimice a oricăreia dintre componentele sale.

Cercetările efectuate între 1954 și 1957 de Vernon Ingram au rezolvat această întrebare. Acest cercetător a arătat că modificarea chimică are loc în structura primară a porțiunii de globină a moleculei de hemoglobină . Folosind tehnica amprentării moleculare, prezentată în Figura 14.14(b), Ingram a demonstrat că compoziția în aminoacizi a HbS diferă de cea a HbA. Hemoglobina umană adultă conține, în structura sa cuaternară, două lanțuri alfa (κ) identice de 141 de aminoacizi și două lanțuri beta *(ß) identice* de 146 de aminoacizi.

Tehnica amprentării moleculare implică digestia enzimatică a proteinei în fragmente peptidice. Amestecul este plasat pe hârtie absorbantă și supus unui câmp electric, în care migrarea are loc în funcție de sarcina netă. Hârtia este apoi rotită într-un unghi drept față de poziția anterioară și plasată într-un solvent, unde acțiunea cromatografică determină migrarea peptidelor într-o a doua direcție. Rezultatul final este o separare bidimensională a fragmentelor peptidice într-un model caracteristic de pete sau „amprente moleculare ". Experimentul lui Ingram a arătat că HbS și HbA diferă doar prin unul dintre fragmentele lor peptidice [Figura 14.14 (b)]. Analizele ulterioare au relevat o modificare a unui singur aminoacid: la a șasea poziție a lanțului p , o valină substituie un acid glutamic, justificând astfel diferența dintre peptide [Figura 14.14 (c)].

Această descoperire este importantă din mai multe motive . Ea stabilește clar că o singură genă furnizează informațiile genetice pentru un lanț polipeptidic. Studiile asupra HbS demonstrează, de asemenea, că o mutație poate afecta fenotipul prin direcționarea substituției unui singur aminoacid. În plus, oferind o explicație pentru anemia falciformă, a stabilit conceptul de boală moleculară moștenită . În cele din urmă, această lucrare a condus la investigarea tuturor hemoglobinelor umane, ceea ce a furnizat informații genetice valoroase.

În Statele Unite, anemia falciformă se găsește aproape exclusiv în populația afro-americană. Afectează unul din 625 de nou-născuți din această populație. În prezent, există între 50.000 și 75.000 de persoane afectate . În aproximativ unul din 145 de cupluri afro-americane , ambii soți sunt purtători heterozigoți. În aceste cazuri, fiecare dintre copiii lor are o șansă de 25% de a moșteni boala .

Hemoglobinele umane

După ce vom plasa hemoglobinele umane în contextul lor istoric, vom încheia această prezentare oferind informații actualizate despre ceea ce se știe despre aceste molecule la specia noastră. Analizele moleculare arată că un om produce diferite molecule de hemoglobină în diferite etape ale ciclului său de viață. Toate sunt tetramerice și sunt compuse din diferite combinații de șapte lanțuri polipeptidice distincte, fiecare codificat de o genă diferită. Expresia acestor gene este reglată în timpul dezvoltării.

Aproape toată hemoglobina adultă este HbA, care conține două lanțuri *alfa.* și două *lanțuri p.* Rețineți că mutația care provoacă - anemia falciformă implică *lanțul phi.* HbA1c reprezintă aproximativ 98% din hemoglobina totală găsită în eritrocitele unei persoane cu vârsta peste șase luni. Restul de 2% este HbA2 , o componentă minoră la adulți. Această moleculă conține două lanțuri x și două lanțuri delta (5). Lanțul o este foarte similar cu lanțul p , fiind compus din 146 de aminoacizi.

În timpul dezvoltării embrionare și fetale, se găsește un grup diferit de hemoglobine. Primul grup produs se numește Gower 1, care conține două lanțuri zeta (ε), foarte asemănătoare cu lanțurile x , și două lanțuri epsilon (ε) , foarte asemănătoare cu lanțurile α . La opt săptămâni de gestație, o altă moleculă de hemoglobină cu lanțuri diferite înlocuiește treptat această formă embrionară. Această moleculă se numește HbF, sau hemoglobină fetală, și este compusă din două lanțuri x și două lanțuri gamma (y). Există două tipuri de lanțuri y , numite Gy si Ay · Ambele sunt foarte asemănătoare cu lanțul *p* și diferă una de cealaltă doar printr-un aminoacid. Aceste lanțuri persistă până la naștere, după care HbF este din nou înlocuită treptat de HbA și HbA2 . Tabelul 14.2 rezumă nomenclatura și secvența de apariție a celor cinci tetrameri descriși.

H care formează hemoglobina umană H de la concepție până la vârsta adultă

Tipul de hemoglobină	Lanțurile care le formează
Gower 1-embrionar	Gc2
HbF-fetală	un 2 * 7'2
HbA1c la adulți	«2 02
HbA2 . minorități adulte	un 2 *sau* 2

14,8

Secvența de nucleotide a unei gene și secvența de aminoacizi a proteinei corespunzătoare prezintă coliniaritate

Odată ce s-a stabilit că genele specifică sinteza lanțurilor polipeptidice, următoarea întrebare logică a fost cum

poate fi transferată informația genetică conținută în secvența de nucleotide a unei gene la secvența de aminoacizi a unui lanț polipeptidic. Părea cel mai probabil să existe o relație coliniară între cele două molecule. Adică, ordinea nucleotidelor din ADN-ul unei gene se corelează direct cu ordinea aminoacizilor din polipeptidul corespunzător - conceptul de coliniaritate.

Primele dovezi experimentale care susțin acest concept au provenit din studiile lui Charles Yanofsky asupra *genei trpA,* care codifică subunitatea A a enzimei *triptofan sintază* din *E. coli.* Yanofsky a izolat mulți mutanți independenți care își pierduseră această activitate enzimatică. Apoi a cartografiat diferitele mutații, stabilind locațiile lor respective în cadrul genei. De asemenea, a determinat unde a avut loc substituția aminoacizilor în fiecare proteină mutantă. Când a comparat cele două seturi de date, relația coliniară a devenit evidentă. Locația fiecărei mutații în gena *trpA* se corelează cu poziția aminoacidului modificat în polipeptida A a triptofan sintazei. Această comparație este ilustrată în Figura 14.15.

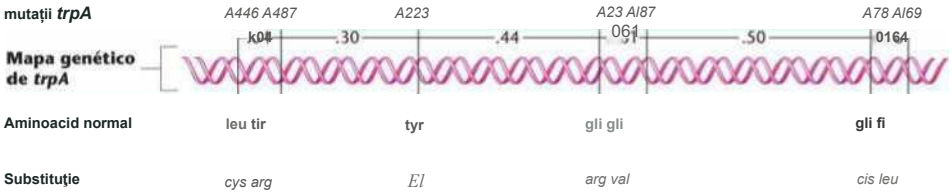
14,9

Variația structurii proteinelor stă la baza diversității biologice

Spre deosebire de acizii nucleici, care stochează și exprimă - informații genetice, proteinele, ca produse finale ale expresiei genelor, sunt mai strâns legate de funcția biologică. Variația funcției biologice este cea care oferă baza diversității între tipurile de celule și organisme. Ce anume le permite proteinelor să efectueze sau să controleze un număr enorm de activități complexe și importante într-un organism? După cum vom vedea, secretul complexității funcției proteinelor constă în incredibila diversitate structurală a proteinelor.

Înainte de a începe explicațiile, trebuie să facem diferența între polipeptide și proteine. Polipeptidele, pe scurt , sunt precursorii proteinelor. Astfel, pe măsură ce polimerul de aminoacizi este asamblat și apoi eliberat din ribozom în timpul traducerii, acesta se numește polipeptidă . După ce polipeptida se pliază și adoptă o - conformație tridimensională funcțională, aceasta se numește *proteină.* În majoritatea cazurilor, mai multe polipeptide se combină în timpul acestui proces pentru a produce o structură proteică și mai complexă . Această conformație tridimensională în spațiu este esențială pentru funcția specifică a unei proteine și este ceea ce o distinge de alte proteine .

Lanțurile polipeptidice ale proteinelor, la fel ca acizii nucleici , sunt polimeri liniari, neramificați . În marea majoritate a organismelor, există 20 de aminoacizi care servesc drept subunități (blocuri de construcție) pentru proteine §§§§. Fiecare aminoacid are o grupare carboxil, o grupare amino și o grupare radicală (R) (un lanț lateral care determină tipul de aminoacid) legate covalent de un atom de carbon central (C). Figura 14.16 prezintă cele 20 de grupări R care definesc cei 20 de aminoacizi prezenți în proteine . Grupările R variază în structura lor și pot fi împărțite în patru clase principale : (1) nepolare (hidrofobe); (2) polare (hidrofile); (3) încărcate.



Termenul „lanț polipeptidic" se referă la poziția relativă a diferitelor lanțuri. Aceste tipuri de proteine sunt numite oligomerice , iar fiecare lanț este numit *protomer sau* , mai puțin formal , *subunitate.* Protomerii au conformații care se îmbină într- un mod specific și complementar. Structura hemoglobinei, o proteină oligomerică formată din patru protomeri (două lanțuri Z și două lanțuri P), a fost studiată în detaliu. Structura sa cuaternară este prezentată în Figura 14.20 . Majoritatea enzimelor, inclusiv ADN și ARN polimerazele, prezintă o structură cuaternară.

ACUM REZOLVĂ ASTA

14.3 HbS rezultă din substituția aminoacidului acid glutamic cu valină la poziția 6 a lanțului δ- P al hemoglobinei umane . HbC rezultă dintr -o modificare în aceeași poziție a lanțului *P* , dar lizina înlocuiește acidul glutamic. Consultați tabelul cu coduri genetice (Figura 13.7) și determinați dacă o modificare a unui singur nucleotid poate explica aceste mutații. Apoi, priviți Figura 14.16 și examinați grupările R ale aminoacizilor acid glutamic, valină și lizină. Descrieți diferențele chimice dintre acești trei aminoacizi . Prevedeți cum ar putea aceste modificări să modifice structura moleculei , ducând la o funcție alterată a hemoglobinei .

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să luăm în considerare impactul potențial al diferitelor substituții de aminoacizi datorate modificărilor uneia dintre genele care codifică unul dintre lanțurile care alcătuiesc hemoglobina umană. Cheia rezolvării acesteia este de a lua în considerare și compara structura celor trei aminoacizi (acid glutamic, u-sină și valină) și sarcina lor netă .*

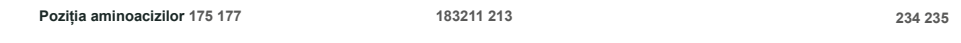


FIGURA 14.15 Demonstrarea coliniarității dintre harta genetică a diferitelor mutații *trpA* ale *E. coli* și aminoacizii afectați ai produsului proteic. Numerele dintre mutații reprezintă distanțele de legătură.

1. Nepolar: hidrofob

CH,
-
YO-

Alanină (Ala, A)

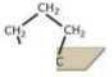
Valină (Val, V)

HC — CHj
CH2

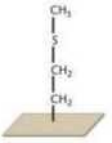
Leucină (Leu, L)

CH, — CH

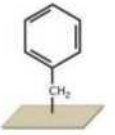
Izoleucină (Ile, I)



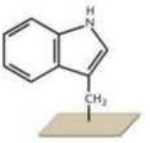
Prolină (Pro, P)



Metionină (Met, M)



Fenilalanină (Phe, F)



Triptofan (Trp, W)

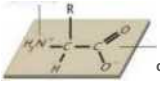
2. Polar: hidrofil

Salut
■C— OH
YO /

Cap. I
H — C — OH
eu 2

SH
Yo
CH
—I

Grupa amino



carboxil

Structura aminoacizilor

Glicină (Gly, G)

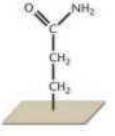
Serină (Ființă, S)

Treonină (Thr, T)

Cisteină (Cys, C)

Tirozină (Tyr, Y)

Asparagină (Asn, N)



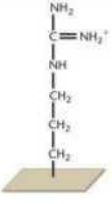
Glutamină (Gin, Q)

3. Polar: încărcat pozitiv (bazic)

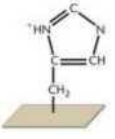
NHj'

CH,

Centrală electrică (Lys, K)



Arginină (Arg, R)



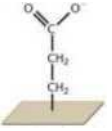
Histidină (His, H)

4. Polares: cargados negativamente (ácidos)

ÇK1

I /

Acid aspartic (Asp, D)
Acid glutamic (Glu, E)



încărcate pozitiv și (4) negativ. Deoarece polipeptidele sunt adesea polimeri lungi și deoarece fiecare poziție poate fi ocupată de oricare dintre cei 20 de aminoacizi cu proprietăți chimice specifice, posibilele variații ale conformației și activității chimice sunt imense. De exemplu, dacă, în medie, o polipeptidă ar fi formată din 200 de aminoacizi (cu o greutate moleculară aproximativă de 20.000 de daltoni) și

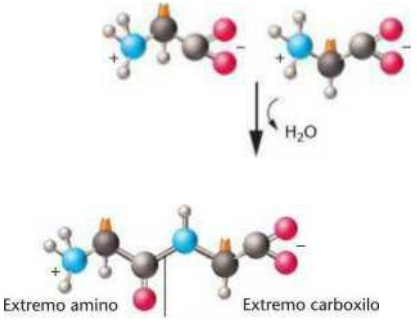


FIGURA 14.17 Formarea unei legături peptidice între doi aminoacizi ca urmare a unei reacții de deshidratare.

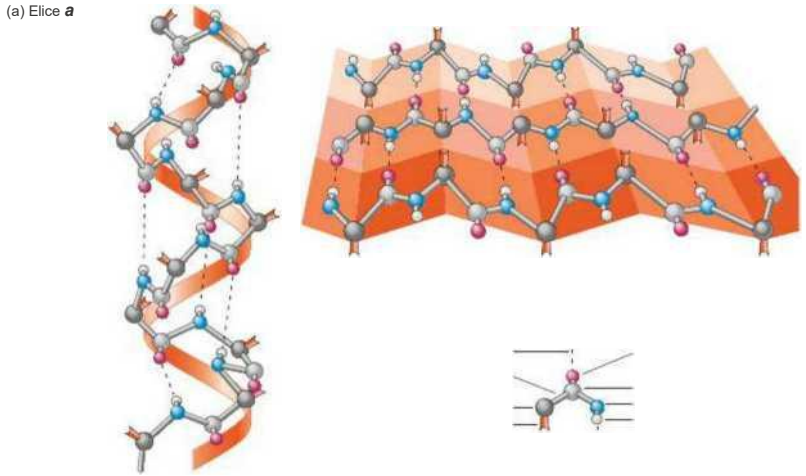
20 de aminoacizi posibili ar putea genera 20.200 de molecule diferite , fiecare cu o secvență specifică.

În jurul anului 1900, chimistul german Emil Fischer a determinat modul în care aminoacizii sunt legați între ei. El a arătat că gruparea amino a unui aminoacid poate reacționa cu gruparea carboxil a unui alt aminoacid într-o reacție de deshidratare (condensare), în care se eliberează o moleculă de H_2O . Legătura covalentă care se formează se numește **legătură peptidică** (Figura 14.17). Doi aminoacizi legați formează o *dipeptidă,* trei o *tripeptidă* și așa mai departe. Odată ce există zece sau mai mulți aminoacizi legați prin legături peptidice, lanțul se numește polipeptidă . În general, și indiferent de lungimea polipeptidei , aceasta va conține o grupare amino la un capăt (N-terminal) și o grupare carboxil la celălalt (C-terminal).

Se recunosc patru niveluri de structură a proteinelor : primar, secundar, terțiar și cuaternar. Secvența liniară de aminoacizi a polipeptidei constituie **structura sa primară** . Această secvență este specificată de secvența dezoxiribonucleotidă a ADN-ului printr-un intermediar ARNm. Structura primară a unei polipeptide ajută la determinarea caracteristicilor specifice ale nivelurilor superioare de organizare pe măsură ce se formează proteina.

Structurile secundare sunt anumite configurații spațiale regulate sau repetitive asumate de aminoacizii aflați aproape unul de celălalt în lanțul polipeptidic. În 1951, Linus Pauling și Robert Corey au prezis, pe baza unor fundamente teoretice, că **helixul alfa** este unul dintre tipurile de structură secundară. Modelul i - helix [Figura 14.18(a)] a fost confirmată prin studii de cristalografie cu raze X. Are formă de tijă și are cea mai mare stabilitate teoretică posibilă . **Helixul** este format dintr-un lanț spiralat de aminoacizi , stabilizat prin legături de hidrogen.

Lanțurile laterale de aminoacizi (grupările R) se extind spre exterior din helix , iar fiecare reziduu de aminoacid ocupă o distanță de 1,5 Å de-a lungul helixului . Există 3,6 reziduuri pe rotație. Deși helixurile legmoarte sunt teoretic posibile, toate helixurile detectate în proteine sunt dextrogitoare.



Tot în 1951, Pauling și Corey au propus o altă structură secundară: configurația în foaie plisată . *În* acest model, un singur lanț polipeptidic se pliază înapoi pe sine sau mai multe lanțuri sunt paralele sau antiparalele unele cu altele . Fiecare structură este - stabilizată prin legături de hidrogen care se formează între atomii lanțurilor adiacente [Figura 14.18(b)]. Se formează un singur plan în zig-zag , în care aminoacizii din rândurile adiacente sunt separați cu 3,5 Å.

Ca regulă generală, majoritatea proteinelor prezintă un amestec de structuri în foi plisate și helix z. Proteinele globulare , majoritatea fiind rotunde și solubile în apă, conțin în general o structură în foi plisate în miezul lor, precum și multe regiuni cu structură în helix z. Proteinele structurale mai rigide, multe dintre ele insolubile în apă, își bazează rigiditatea pe regiuni mai mari de foi plisate . De exemplu , fibroina, proteina pe care o produc viermii de mătase, se bazează în mare măsură pe această structură secundară.

În timp ce structura secundară descrie plierea și interacțiunile aminoacizilor în anumite părți ale unui lanț polipeptidic, structura terțiară definește conformația spațială tridimensională a lanțului în ansamblu. Fiecare polipeptidă se încolăcește, se pliază și se ondulează într-un mod foarte specific, caracteristic fiecărei proteine. Figura 14.19 prezintă un model al structurii terțiare. La acest nivel de structură , trei factori sunt cei mai importanți în determinarea conformației moleculei și stabilizarea acesteia:

1. Legăturile covalente disulfidice se formează între reziduurile de cisteină strâns aliniate pentru a forma aminoacidul special cistină.
2. De obicei, grupările R polare hidrofile sunt situate la suprafața configurației , unde pot interacționa cu apa.
3. În general, grupările R hidrofobe nepolare sunt situate în interiorul moleculei , unde interacționează între ele, împiedicând interacțiunea cu apa.

Este important de menționat că conformația tridimensională - adoptată de fiecare proteină este o consecință a *structurii primare a* polipeptidei. Astfel, codul genetic trebuie doar să specifice secvența de aminoacizi pentru a produce în cele din urmă configurația finală a proteinei. Efectele celor trei factori de stabilizare depind de locația relativă a fiecărui aminoacid în lanț . Pe măsură ce are loc plierea , se produce cea mai stabilă conformație termodinamic. Acest nivel de organizare este extrem de important, deoarece funcția specifică a fiecărei proteine este direct legată de structura sa terțiară.

Conceptul de structură cuaternară a proteinelor se aplică numai celor care sunt alcătuite din mai mult de un element.

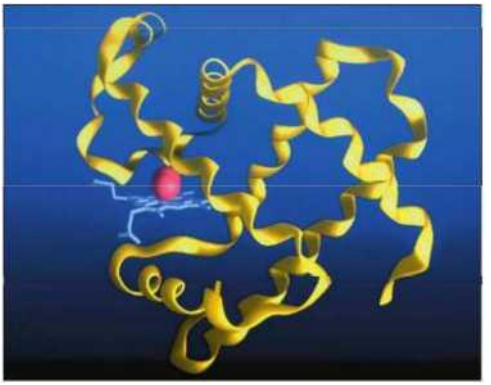


FIGURA 14.19 Nivelul terțiar al structurii proteice a mioglobinei, un pigment respirator. Atomul de oxigen atașat este reprezentat cu roșu.

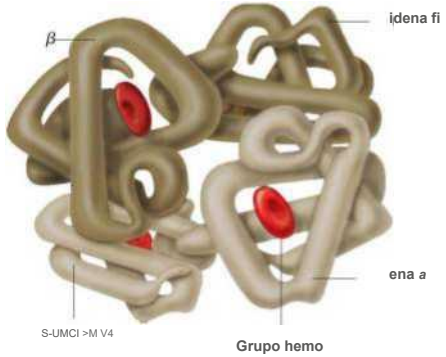


FIGURA 14.20 Nivelul cuaternar al structurii proteice a hemoglobinei. Molecula funcțională este formată din patru lanțuri (două x și două x) care interacționează cu patru grupări hem.

1 4.10

Modificările post-translaționale alterează produsul proteic final

Înainte de a explica funcția proteinelor , este important de menționat că, la fel ca în cazul transcrierilor de ARN, lanțurile polipeptidice sunt adesea modificate după sinteză. Această procesare suplimentară este denumită în general modificare post-translațională. Deși multe dintre aceste modificări sunt transformări biochimice detaliate care depășesc scopul acestei discuții, este important de știut că acestea au loc și sunt cruciale pentru capacitatea funcțională a produsului proteic final. Mai jos sunt prezentate câteva exemple de modificări post-translaționale :

1. *Aminoacidul de la capătul N-terminal este de obicei îndepărtat sau modificat.* De exemplu, gruparea formil sau întregul reziduu de formilmetionină este de obicei îndepărtat enzimatic din polipeptidele bacteriene. Adesea, în lanțurile polipeptidice eucariote, gruparea amino a reziduului inițial de metionină este îndepărtată, iar gruparea amino a reziduului N-terminal este modificată (acetilată).
2. *Uneori, anumite reziduuri de aminoacizi sunt modificate.* De exemplu, unor aminoacizi, cum ar fi tirozina, li se poate adăuga o grupare fosfat la gruparea lor hidroxil . Astfel de modificări creează reziduuri încărcate negativ care pot forma legături ionice cu alte molecule. Procesul de fosforilare este extrem de important pentru reglarea multor activități celulare și rezultă din acțiunea enzimelor numite kinaze . Alte reziduuri de aminoacizi au grupări metil sau *acetil* adăugate enzimatic , ceea ce poate afecta funcția lanțului polipeptidic modificat.
3. *Uneori se adaugă lanțuri laterale de carbohidrați . Aceste lanțuri sunt* legate covalent pentru a forma g/u- coproteine , o categorie importantă de molecule extracelulare, cum ar fi cele care specifică antigenele grupei sanguine ABO la om.
4. *Lanțurile polipeptidice pot fi scurtate.* De exemplu, gena insulinei este mai întâi tradusă într-o moleculă lungă care este redusă enzimatic la forma sa finală de 51 de aminoacizi .
5. *Secvențele de semnalizare sunt îndepărtate.* La capătul N-terminal al unor proteine, există o secvență de până la 30 de aminoacizi care joacă rolul important de a direcționa proteina către locația celulară unde trebuie să acționeze. Această secvență se numește secvență semnal și determină destinația finală a proteinei în celulă. Acest proces se numește direcționare a proteinelor . De exemplu , proteinele destinate secreției sau care trebuie să devină parte a membranei plasmatice depind de secvențe specifice pentru transportul lor inițial către lumenul reticulului endoplasmatic . Deși secvența semnal a diferitelor proteine cu o destinație comună poate diferi în secvența sa primară de aminoacizi , ele au în comun multe proprietăți chimice . De exemplu, cele destinate secreției conțin un lanț de până la 15 aminoacizi hidrofobi , precedat de un aminoacid încărcat pozitiv , situat la capătul N-terminal al secvenței semnal. Odată ce polipeptida este transportată și înainte de a atinge starea funcțională a proteinei , secvența semnal este îndepărtată enzimatic .
6. *Lanțurile polipeptidice formează adesea complexe cu metalele.* Adesea , nivelurile terțiar și cuaternar ale structurii proteinelor includ și depind de atomi metalici . Funcția unei proteine este, așadar, un complex molecular care include atât lanțuri polipeptidice , cât și atomi metalici. Un bun exemplu în acest sens este hemoglobina, care conține patru atomi de fier și patru lanțuri polipeptidice.

Plierea proteinelor și erorile de pliere

Modificările post-translaționale descrise mai sus sunt evident de o mare importanță în atingerea stării funcționale specifice a oricărei proteine date . Întrucât structura tridimensională a moleculei este direct responsabilă

pentru funcția sa specifică, o întrebare importantă este cum se pliază în cele din urmă lanțurile polipeptidice în conformațiile lor finale. Multă vreme, plierea proteinelor a fost considerată un proces spontan în care o moleculă liniară care părăsește ribozomul adoptă o conformație tridimensională termodinamic stabilă, bazată exclusiv pe proprietățile chimice combinate inerente secvenței de aminoacizi. Acesta este într-adevăr cazul multor proteine. Cu toate acestea, numeroase studii au arătat că, pentru alte proteine, plierea corectă depinde de membrii unei familii de molecule numite chaperone. Chaperonele sunt proteine (uneori numite *chaperone* moleculare *sau* chaperonine *)* care mediază procesul de pliere, împiedicând formarea unor modele alternative incorecte. Deși se pot lega de proteina în cauză, așa cum fac enzimele , ele nu devin parte a produsului final. Descoperite inițial în *Drosophila,* unde sunt numite proteine de șoc termic, chaperonele sunt omniprezente, fiind găsite în toate organismele. Sunt prezente chiar și în mitocondrii și cloroplaste.

În celulele eucariote, chaperonele sunt deosebit de importante atunci când translația are loc la ribozomii asociați membranei, unde polipeptida nou tradusă este extrudată în lumenul reticulului endoplasmatic. Chiar și în prezența chaperonelor, pot apărea erori de pliere greșită, așa că există un sistem suplimentar de „control al calității". Pe măsură ce proteinele pliate greșit sunt transportate din reticulul endoplasmatic în citoplasmă, acestea sunt „etichetate" de un alt tip de proteină mică numită ubiquitină. Aceasta formează un complex *poliubiquitină-proteină* care se deplasează către o structură celulară numită proteasom, unde ubiquitinele sunt eliberate, iar proteinele pliate greșit sunt degradate de proteaze.

Plierea proteinelor este un proces critic, nu numai pentru că proteinele pliate greșit pot fi nefuncționale, ci și pentru că proteinele pliate greșit se pot acumula și pot provoca leziuni celulelor și organismelor care le conțin. De exemplu, un grup de tulburări cerebrale transmisibile la mamifere - oile zgâriate , encefalopatia - spongiformă bovină (boala vacii nebune) la bovine și boala Creutzfeldt -Jakob la oameni - sunt cauzate de prezența în creier a prionilor, care sunt agregate ale unei proteine pliate greșit . Proteina pliată greșit (numită PrP_{^{Sv}}) este o versiune modificată a unei proteine celulare normale (numită PrP_{^{c}}) care este sintetizată în neuroni și se găsește în creierul tuturor animalelor adulte. Diferența dintre PrP_{^{c}} și PrP_{Sv} constă în structura lor proteică secundară. În mod normal, PrP c neinfecțioasă se pliază pentru a forma o spirală, în timp ce PrP Sc infecțioasă se pliază pentru a forma o foaie plisată (^{fi}). Când o moleculă $^{anormală\ de\ PrPSc}$ intră în contact cu o moleculă $^{de\ PrPSc}$, proteina normală se pliază din nou , adoptând configurația anormală. Procesul continuă ca o reacție în lanț, cu rezultate potențial devastatoare - formarea de particule prionice care, în cele din urmă, distrug creierul. Prin urmare, acest grup de tulburări poate fi considerat tulburări de structură secundară . În prezent, multe laboratoare studiază plierea și plierea greșită a proteinelor , în special în raport cu genetica. Numeroase tulburări umane moștenite sunt cauzate de proteine pliate greșit care formează agregate anormale . Anemia falciformă, despre care am discutat anterior în capitol, este un exemplu, în care lanțurile i ale hemoglobinei sunt modificate ca urmare a unei singure *modificări* a aminoacidului , determinând agregarea moleculelor în eritrocite, cu rezultate - devastatoare . Este cunoscută o formă moștenită autosomal dominantă a bolii Creutzfeldt-Jakob, în care o mutație modifică secvența de aminoacizi a PrP , ducând la formarea de prioni. Mai multe boli neurodegenerative progresive, cum ar fi boala - Huntington , boala Alzheimer și boala Parkinson, sunt asociate cu formarea de agregate proteice anormale în creier. Boala Huntington este moștenită într - un model autosomal dominant , în timp ce factorii genetici implicați în bolile Alzheimer și Parkinson sunt mai puțin clar definiți.

1 4.11

Proteinele funcționează adoptând roluri foarte diverse.

Esența vieții pe Pământ constă în diversitatea funcțiilor celulare . În timp ce ADN-ul și ARN-ul servesc drept vehicule pentru stocarea și exprimarea informațiilor genetice , proteinele sunt *mijloacele* prin care se desfășoară funcția celulară . Iar capacitatea celulelor de a-și asuma structuri și funcții diferite este ceea ce distinge majoritatea eucariotelor de organismele mai puțin avansate din punct de vedere evolutiv , cum ar fi bacteriile . Prin urmare , o înțelegere de bază a funcției proteinelor este esențială pentru o imagine cuprinzătoare a proceselor genetice .

Proteinele sunt cele mai abundente macromolecule din celule . Ca produs final al genelor, acestea îndeplinesc multiple funcții. De exemplu, pigmenții respiratori hemoglobina și mioglobina transportă oxigenul, care este esențial pentru metabolismul celular. Colagenul și keratina sunt două proteine structurale asociate cu pielea , țesutul conjunctiv și părul organismelor . Actina și miozina sunt două proteine contractile , foarte abundente în țesutul muscular, în timp ce tubulina

stă la baza funcției microtubulilor în fusurile mitotice și meiotice. Alte exemple includ imunoglobulinele, care acționează la nivelul sistemului imunitar al vertebratelor; proteinele de transport, implicate în mișcarea moleculelor prin membrane; unii hormoni și receptorii acestora, care reglează diverse tipuri de activități chimice; histonele, care se leagă de ADN în organismele eucariote; și factorii de transcripție, care reglează expresia genelor.

Totuși, cel mai mare și mai divers grup de proteine (din punct de vedere al funcției) sunt enzimele, la care ne-am referit pe parcursul acestui capitol. Enzimele sunt specializate în catalizarea reacțiilor chimice din celulele vii. Ca toți catalizatorii, enzimele - cresc viteza la care o reacție chimică atinge echilibrul, fără a altera punctul final de echilibru. Proprietățile lor catalitice extraordinar de specifice determină capacitatea metabolică a oricărui tip de celulă și oferă baza a ceea ce numim biochimie . Pe parcursul acestui text, sunt descrise funcțiile specifice ale multor enzime implicate în procesele genetice și celulare ale celulelor.

Cataliza biologică este un proces în care enzimele scad energia de activare a unei reacții date (Figura 14.21). Energia de activare este creșterea energiei cinetice pe care moleculele trebuie să o atingă înainte de a reacționa între ele. Deși această stare poate fi atinsă prin creșterea temperaturii , enzimele permit reacțiilor biologice să aibă loc la o temperatură fiziologică mai scăzută . Astfel, enzimele fac posibilă viața așa cum o știm .

Proprietățile catalitice ale unei enzime sunt determinate de configurația chimică a situsului activ al moleculei . Acest situs este asociat cu o fantă, un șanț sau o groapă pe suprafața enzimei , care leagă reactanții sau substraturile, facilitând interacțiunea acestora . Reacțiile catalizate de enzime controlează activitățile metabolice ale celulei . Fiecare reacție este fie *catabolică* , fie *anabolică.* Catabolismul este descompunerea moleculelor mari în molecule mai mici și mai simple , eliberând energie chimică . Anabolismul este faza sintetică a metabolismului , care furnizează diversele componente care alcătuiesc acizii nucleici, proteinele , lipidele și carbohidrații .

1 4.12

Proteinele sunt alcătuite din unul sau mai multe domenii funcționale

Vom încheia acest capitol printr-o scurtă discuție a descoperirii importante conform căreia regiunile formate de secvențe specifice de aminoacizi sunt asociate cu funcții specifice în proteine. Aceste secvențe, compuse în general între 50 și 300 de aminoacizi, constituie ceea ce se numesc domenii proteice și sunt

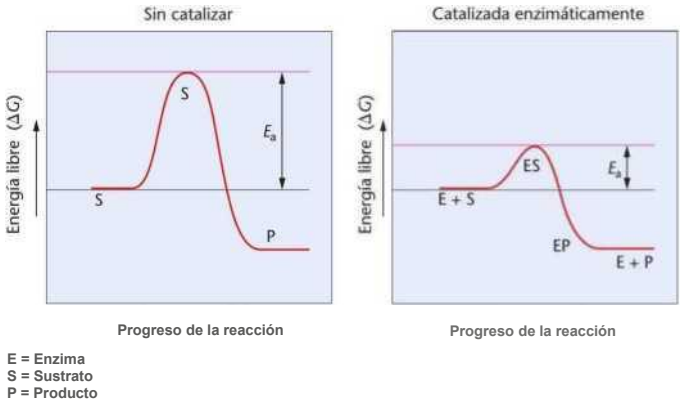


FIGURA 14.21 Requisitos energéticos de una reacción química no catalizada y una reacción química catalizada enzimàticamente. La energía de activación (E_a) necesaria para iniciar la reacción es sustancialmente más baja como consecuencia de la catálisis.

reprezentate de porțiuni modulare ale proteinei care se pliază independent de restul moleculei într-o conformație stabilă specifică. Domenii diferite oferă capacități funcționale distincte. Unele proteine conțin un singur domeniu, în timp ce altele conțin două sau mai multe.

Importanța domeniilor constă în structura terțiară a proteinei. Fiecare domeniu poate conține un amestec de structuri secundare, inclusiv helixuri și foi plisate. Conformația specifică asumată de un anumit domeniu conferă o funcție specifică proteinei. De exemplu, un domeniu poate servi drept situs catalitic al unei enzime sau îi poate oferi capacitatea de a se lega de un ligand specific. Astfel, atunci când se studiază proteinele, se vor întâlni expresii precum *domenii catalitice, domenii de legare a ADN-ului* și așa mai departe. Pe scurt, o proteină poate fi considerată a fi compusă dintr-o serie de module structurale și funcționale. Evident, prezența mai multor domenii în aceeași proteină crește versatilitatea fiecărei molecule, crescând complexitatea sa funcțională.

Amestecarea exonilor

În 1977, Walter Gilbert a propus o ipoteză interesantă pentru a explica originea genetică a domeniilor proteice. Gilbert a sugerat că regiunile funcționale ale genelor din organismele superioare sunt compuse din colecții de exoni, care erau inițial prezenți în genele ancestrale și au fost reuniți prin recombinare în cursul evoluției. Referindu-se la acest proces ca amestecarea exonilor, Gilbert a propus că exonii, la fel ca domeniile proteice, sunt, de asemenea, modulari și că, în timpul evoluției, exonii ar fi putut fi amestecați între genele eucariote, rezultând în gene diferite cu domenii similare.

Mai multe observații susțin această ipoteză. Majoritatea exonilor sunt destul de mici, având în medie 150 de perechi de baze și codificând aproximativ 50 de aminoacizi, ceea ce este în concordanță cu dimensiunile multor domenii funcționale din proteine. În al doilea rând, evenimentele de recombinare care duc la amestecarea exonilor ar fi de așteptat să aibă loc în regiunile genetice reprezentate de introni. Deoarece intronii pot acumula liber mutații fără a dăuna organismelor, evenimentele de recombinare ar tinde să randomizeze și mai mult secvențele lor nucleotidice. Pe perioade lungi de evoluție, diversitatea secvențelor ar crește. Într-adevăr, iată ceea ce se observă: intronii variază între 50 și 20.000 de baze, iar secvențele lor de baze sunt destul de aleatorii.

de cercetare a fost îndreptat către analiza structurii genelor. În 1985, au fost prezentate dovezi mai directe în favoarea propunerii modulului exonic a lui Gilbert. De exemplu, a fost izolată și secvențiată gena umană care codifică receptorul membranar pentru lipoproteinele cu densitate mică (LDL). *Proteina receptorului* LDL Este esențială pentru transportul colesterolului plasmatic în celule. Această proteină mediază endocitoza și se așteaptă să aibă numeroase domenii funcționale, inclusiv domenii capabile să se lege specific de substraturile LDL și să interacționeze cu alte proteine situate la diferite adâncimi în membrană, pe măsură ce LDL este transportat prin aceasta. În plus, molecula receptor este modificată post-translațional prin adăugarea unui carbohidrat; prin urmare, trebuie să existe un domeniu care se leagă de acest carbohidrat. Având în vedere aceste constrângeri funcționale, s-ar putea prezice că polipeptida receptorului LDL ar trebui să conțină mai multe domenii distincte.

Analiza detaliată a genei care codifică receptorul LDL susține conceptul de module exonice și modificarea acestora în timpul evoluției. Această genă este destul de mare, având 45.000 de perechi de baze, și conține 18 exoni, fiecare conținând puțin mai puțin de 2.600 de nucleotide. Acești exoni codifică diversele domenii funcționale ale proteinei și par *să* fi fost recrutați din alte gene în timpul evoluției.

Figura 14.22 ilustrează aceste relații. Primul exon codifică o secvență semnal care este îndepărtată din proteină înainte ca receptorul LDL să devină parte a membranei. Următorii cinci exoni reprezintă domeniul care specifică situsul de legare a colesterolului. Acest domeniu constă dintr-o secvență de 40 de aminoacizi repetată de șapte ori. Domeniul următor, codificat de opt exoni,

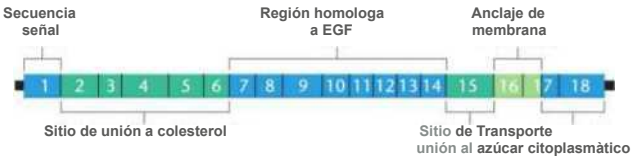


FIGURA 14.22 Los 18 exones que forman el gen que codifica la proteina del receptor de LDL están organizados en cinco dominios funcionales y en una secuencia señal.

constă dintr-o secvență de 400 de aminoacizi care are o omologie izbitoare cu *factorul de creștere epidermală (EGF)* de șoarece (o secvență similară se găsește și în trei proteine implicate în coagularea sângelui). Această regiune conține trei secvențe repetitive de 40 de aminoacizi. Al cincisprezecelea exon specifică domeniul pentru adăugarea de carbohidrați post-translațională, în timp ce următorii doi specifică regiuni ale proteinei care se integrează în membrană, ancorând receptorul la situsuri specifice de pe suprafața celulară numite *gropi acoperite.*

Aceste observații asupra exonilor receptorilor LDL susțin puternic teoria amestecării exonilor în timpul evoluției. Cu siguranță, nu există niciun dezacord cu privire la conceptul conform căruia domeniile proteice sunt responsabile pentru interacțiuni moleculare specifice.

Originea domeniilor proteice

Ceea ce este controversat și sugestiv în legătură cu teoria amestecării exonilor este întrebarea când au apărut intronii pentru prima dată în stadiul evolutiv. În 1978, W. Ford Doolittle a propus că aceste secvențe intercalate făceau parte din genomul celor mai vechi strămoși ai eucariotelor moderne. Susținând această idee a „intronului timpuriu", Gilbert a susținut că, dacă se găsesc similarități în secvențele de ADN intronic la poziții identice în cadrul genelor comune eucariotelor înrudite la distanță (cum ar fi oamenii, puii și porumbul), acestea trebuie să fi fost prezente și în genomurile ancestrale timpurii .

Dacă propunerea lui Doolittle este corectă, de ce majoritatea procariotelor nu au introni și de ce sunt atât de rari la drojdie? Gilbert susține că intronii au fost prezenți la un moment dat în evoluție, dar s-au pierdut pe măsură ce genomurile acestor - organisme primitive au evoluat. Acest lucru s-a întâmplat ca urmare a unei presiuni selective puternice de a-și eficientiza cromozomii pentru a minimiza cheltuielile energetice în timpul replicării și expresiei genelor. Mai mult, această eficientizare a dus la producerea unui ARNm mai mult fără erori . Cu toate acestea, susținătorii teoriei „intronului târziu" , cum ar fi Jeffrey Palmer, susțin că intronii au apărut mult mai târziu în evoluție, ca parte a unui singur grup de eucariote, care sunt strămoșii membrilor eucarioți actuali, dar nu și ai procariotelor.

Apariția secvențierii genomice la scară largă nu a făcut decât să intensifice această controversă. Acum avem capacitatea de a descifra secvența completă de nucleotide a întregului ADN dintr-un anumit organism. Prin compararea secvențelor de ADN care codifică și care nu codifică aminoacizi la speciile aflate la distanță evolutivă, geneticienii speră să obțină mai multe informații despre modul în care au evoluat aceste secvențe. Până în prezent, nu s-au găsit dovezi concludente care să susțină nici teoria „ intronului timpuriu", nici teoria „intronului târziu", iar această întrebare rămâne dificil de rezolvat.

EXPLORARE
DE GENOMICĂ

Instrumente de traducere și Swiss-Prot pentru studiul secvențelor proteice

. DOMENIU *de studiu: Explorare genomică*

M. Multe dintre bazele de date și programele bioinformatice pe care le-am folosit pentru exercițiile de *Explorarea genomică* s-a concentrat pe manipularea și analizarea secvențelor de ADN și ARN. Cu toate acestea, oamenii de știință care lucrează în diferite aspecte ale funcției proteinelor au la dispoziție și o gamă largă de instrumente și baze de date bioinformatice prin intermediul internetului . Multe dintre aceste site-uri au fost dezvoltate datorită

Proteomica este studiul tuturor proteinelor exprimate într -o celulă sau țesut . Vom discuta proteomica mai detaliat în Capitolul 21 .

În acest exercițiu de explorare *genomică* , Vom folosi programul **ExPASy** *(Expert Protein Analysis System)* pentru a traduce un segment genetic într- un potențial polipeptid. Apoi , vom explora bazele de date pentru a afla mai multe despre acest polipeptid.

■ **Exercițiul I. Traducerea unei secvențe de nucleotide și analiza unui polipeptid**

ExPASy (Expert Protein Analysis System), găzduit de Institutul Elvețian de Bioinformatică , oferă o multitudine de - resurse pentru studii proteomice . În acest exercițiu , vom folosi un program ExPASy numit Translate Tool pentru a traduce o secvență de nucleotide într- o secvență - polipeptidică . Deși multe alte programe sunt disponibile pe web în acest scop, ExPASy este unul dintre cele mai ușor de utilizat pentru studenții la genetică . Translate Tool vă permite să generați o secvență polipeptidică prezisă dintr -o genă clonată și apoi să căutați cadre de citire deschise și variații ale polipeptidelor rezultate.

1. Următoarea este o secvență parțială a unei gene umane , bazată pe o secvență de ADN complementară (ADNc). În Capitolul 20, vom vedea că secvențele de ADNc sunt copii ale ADN-ului complementare moleculelor de ARNm exprimate într -o celulă. Înainte de a traduce această secvență în ExPASy, efectuați o căutare BLAST nucleotidă-nucleotidă pe site -ul NCBI *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BI_AST).* Pentru a identifica gena corespunzătoare acestei secvențe , consultați exercițiul Exploring Genomics din Capitolul *10* dacă aveți nevoie de ajutor cu căutările BLAST.

   ACATTGCTTCTGACACAATTGT
   GTTCACTAGCAACCTCAAACAGA
   CACCATGGTGCATCTGACTCCT
   GAGGAGAAGTCTGCCGTTACT
   GCCCTGTGGGGCAAGGTGA
   ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGA
   GGCCCTGGGCAG

2. Accesați programul ExPASy Translate Tool la http://us.expasy.org/tools/dna.html . Copiați și lipiți secvența de ADNc în Translate Tool și faceți clic pe *Translate - Sequence* . pentru a genera posibile secvențe polipeptidice codificate de acest ADNc.

3. Examinați rezultatele traducerii și apoi - răspundeți la următoarele întrebări:

   a) Instrumentul Translate a furnizat o secvență polipeptidică sau mai multe secvențe posibile?

   b) Dacă rezultatele traducerii arată secvențe polipeptidice multiple , ce înseamnă acest lucru? Explicați răspunsul.

   c) Consultați Figura 14.14 din capitolul . Pe baza acestei figuri, care față de citire generată de Translate Tool pare a fi corectă?

4. ExPASy oferă, de asemenea, acces la o multitudine de informații despre acest polipeptid , conectându-se la numeroase baze de date , cum ar fi UniProt KB/Swiss-Prot, o bază de date cu secvențe de proteine administrată de Institutul Elvețian pentru Bioinformatică (SIB) și Institutul European de Bioinformatică (EBI), și Banca de Date cu Proteine . UniProt KB/Swiss-Prot este utilizat pe scară largă de oamenii de știință din întreaga lume . UniProt KB / Swiss-Prot *(http://ca.expasy.org/sprot/hpi)* oferă acces la o cantitate vastă de informații despre genomul uman și proteomică .

5. Pentru a afla mai multe despre caracteristicile acestei polipeptide , cel mai bine este să lucrați cu secvența completă . Pentru a obține o secvență completă , faceți clic pe faza de citire pe care o considerați corectă .

6. Pentru a obține secvența de aminoacizi a polipeptidei complete , faceți clic pe *metionină (m)* Introduceți primul aminoacid al polipeptidei și apoi utilizați linkul „BLAST" din partea de jos a paginii următoare pentru a efectua o căutare BLAST. Din pagina cu rezultate BLAST, localizați intrarea P68871 pentru UniProtKB/Swiss-Prot; acesta este un număr de acces pentru secvența proteinei , similar cu numerele de acces atribuite secvențelor de ADN și ARN și este exact potrivirea corectă pentru această secvență. Faceți clic pe acest link pentru a accesa un raport complet despre proteină. Asigurați-vă că identitatea acestei proteine corespunde cu ceea ce ați descoperit la pasul 1 .

7. Derulați dincolo de referințele din raportul Swiss - Prot; apoi explorați următoarele caracteristici:

   a) *Baze de date cu structuri 3D — prezintă* reprezentări modelate 3D care arată aranjamentele de pliere ale polipeptidelor.

   b) În *secțiunea Baze de date cu geluri 2D,* utilizați linkul *Swiss-2DPAGE* pentru a vizualiza geluri 2D ale acestei polipeptide din diferite probe de țesut . Consultați Figura 21.24 pentru o reprezentare a gelurilor 2D. Când vizualizați o imagine 2D a gelului utilizând această funcție, faceți clic pe linkurile de sub *Locații pe hartă* pentru a identifica puncte specifice dintr- un gel care corespund acestei polipeptide.

   c) Linkurile din secțiunea *Baze de date familiale și de domenii* vă vor permite să accesați o multitudine de informații despre acest polipeptid și alte polipeptide și proteine înrudite .

   d) Explorează *categoria Altele și vizitează* linkul *DrugBank* , care oferă informații despre medicamentele care se leagă de acest polipeptid sau îl afectează .

   e) În partea de jos a paginii, sub *Instrumente de analiză a secvențelor, utilizați* funcția *ProtParam* pentru a afla mai multe despre structurile secundare prezise pe care le formează acest polipeptid .

CASO DE ESTUDIO \ *Lost in translation*

En la década de 1990 se describió por primera vez, mediante imágenes por resonancia magnética (MRI), un trastorno cerebral recesivo denominado leucoencefalopatía con sustancia blanca evanescente (VWM). Los individuos afectados muestran un deterioro neurológico temprano en la niñez, falleciendo poco después del diagnóstico o bien pueden expresar una forma lenta y progresiva de la enfermedad. VWM está provocado por mutaciones en uno cualquiera de los cinco genes que codifican las subunidades proteicas del factor de iniciación de la traducción 2B. Este factor ayuda a posicionar el ribosoma en el ARNm durante el inicio de la traducción. Se sabe que otras células que sintetizan Cantități mari de proteine, cum ar fi celulele secretoare de insulină, sunt , de asemenea, rapid afectate. Multe întrebări despre această boală rămân fără răspuns .

1. Având în vedere cele două forme ale bolii, care credeți că este posibila natură a mutațiilor VWM? De ce credeți că este o mutație recesivă și nu una dominantă?
2. De ce sunt unele celule din organism mai susceptibile decât altele la mutații ale genelor care codifică factorul 2B?
3. Cum am putea studia aspectele celulare și moleculare ale VWM?

Puntos de resumen

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

1. Traducerea este sinteza lanțurilor polipeptidice care are loc sub conducerea ARNm și în asociere cu ribozomii .
2. Traducerea depinde de moleculele de ARNt care servesc ca adaptori între codonii ARNm și aminoacizii corespunzători.
3. Procesul de translație are loc în asociere cu ribozomii și, la fel ca transcripția , poate fi subdivizat în etapele de inițiere , elongație și terminare. Acest proces se bazează pe afinitățile de împerechere a bazelor dintre nucleotidele complementare .
4. Tulburările metabolice ereditare se datorează, în general, pierderii activității enzimatice ca urmare a mutațiilor genelor care codifică aceste proteine.
5. Lucrările lui Beadle și Tatum cu mutații nutriționale în *Neurospora* Acest lucru i-a determinat să propună ideea că fiecare genă codifică o enzimă .
6. Cercetările lui Pauling și Ingram asupra hemoglobinei la pacienții cu anemie falciformă au condus la o modificare a ipotezei unei singure enzime , înlocuind-o cu ideea că fiecare genă codifică un lanț polipeptidic.
7. Proteinele, produsul final al genelor, prezintă patru niveluri de organizare structurală care oferă baza chimică pentru conformația lor tridimensională, care stă la baza funcției moleculei .
8. Dintre numeroasele funcții pe care le îndeplinesc proteinele , cea mai influentă este cea a enzimelor , care acționează ca niște catalizatori biologici foarte specifici, jucând un rol fundamental în producerea tuturor tipurilor de molecule în sistemele biologice .
9. La eucariote, proteinele conțin unul sau mai multe domenii funcționale , fiecare dintre acestea fiind prescris de regiuni exonice împrăștiate în gene . Fiecare domeniu specific conferă proteinei anumite capacități funcționale, iar aceste domenii par să fi fost „amestecate" între gene în timpul evoluției.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Răspunsurile de creștere din graficul de mai jos au fost obținute prin cultivarea a patru tulpini mutante de *Neurospora* pe medii diferite, fiecare conținând unul dintre cei patru compuși înrudiți, A, B, C și D. Niciunul dintre acești mutanți nu poate crește în mediu minimal. Trageți toate concluziile posibile din aceste date.

Creștere bazată pe produs

Mutație	LA	B.	C.	D.
1		-		
2	+	+	-	♦
3	+	♦	-	—
4	—	♦		——

Soluție. Nu se poate concluziona nimic despre mutația *1,* cu excepția faptului că îi lipsește un factor de creștere esențial, care s-ar putea să nu fie nici măcar legat de calea metabolică ce implică A, B, C și D. Nici despre substanța C nu se poate concluziona. Dacă este implicată într-o cale metabolică cu ceilalți compuși, este un produs sintetizat înainte de sinteza genelor A, B și D. Acum trebuie să analizăm aceste trei componente și controlul sintezei lor de către enzimele codificate de genele 2, 3 și 4. Deoarece produsul B permite creșterea în toate cele trei cazuri, ar putea fi considerat „ produsul final" - depășește blocajul în primele trei cazuri. Folosind un raționament similar , produsul A precede B în calea metabolică , deoarece A depășește blocajul în două dintre cele trei etape. Produsul D precede B, rezultând următoarea soluție parțială:

$$C(?) \longrightarrow D \longrightarrow A \longrightarrow B$$

Să determinăm acum ce mutație controlează fiecare etapă. Deoarece produsele D, B și A atenuează efectele mutației 2, această mutație trebuie să controleze o etapă anterioară acestor trei produse, direcționând probabil conversia către D, deși nu putem fi siguri de acest lucru. B și A atenuează efectele mutației 3 , deci efectul său trebuie să preceadă ambele produse din cale . Astfel , vom atribui faptul că aceasta controlează conversia lui D în A. În mod similar, putem atribui faptul că mutația 4 convertește A în B , obținând următoarea soluție mai completă :

$$C(?) \xrightarrow{2(?)} D \xrightarrow{3} A \xrightarrow{4} B$$

DE CUM ȘTIM?

Problemas y preguntas para la discusión

1. În acest capitol , ne-am concentrat pe traducerea ARNm în proteine, precum și pe structura și funcția proteinelor . Pe parcursul acestui proces, am avut numeroase ocazii să analizăm metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol , ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?

   (a) Ce informații obținute experimental au condus la propunerea lui Holley privind modelul bidimensional de tip trifoi al ARNt ?
   (b) Ce informații experimentale confirmă faptul că anumiți codoni ai ARNm specifică terminarea lanțului bipeptidic lipidic în timpul traducerii ?
   (c) Cum știm, studiind mutațiile nutriționale ale *Neurospora,* că o genă codifică o enzimă?
   (d) Cum am ajuns la concluzia că proteinele sunt expresia finală a expresiei genelor ?
   (c) Ce informații experimentale confirmă direct că codul genetic , prezentat în Figura 13.7, este corect? (f) De unde știm că structura unei proteine este strâns legată de funcția acelei proteine?

2. Enumerați și descrieți funcția tuturor moleculelor constitutive prezente într-un poliribozom .
3. Comparați funcțiile ARNt și ARNm în timpul traducerii și enumerați toate enzimele implicate în procesele de transcripție și traducere.
4. Francis Crick a propus „ ipoteza adaptorului " pentru funcția ARNt . De ce a ales această descriere?
5. În timpul traducerii, ce moleculă poartă codonul ? Și anticodonul?
6. Lanțul Z al hemoglobinei eucariote este alcătuit din 141 de aminoacizi. Care este numărul minim de nucleotide dintr-un ARNm care codifică acest lanț polipeptidic ?
7. Având în vedere că în ARNm fiecare nucleotid are o lungime de 0,34 nm, câte triplete pot exista simultan într- un ribozom care are un diametru de 20 nm ?
8. Rezumați pașii de încărcare a ARNt cu aminoacidul corect .
9. Pentru a-și îndeplini funcția, fiecare ARN de transfer necesită cel puțin patru situsuri de recunoaștere specifice, inerente structurii sale terțiare . Care sunt acestea?
10. Ce sunt izoacceptorii de ARNt? Presupunând că există doar 20 de aminoacil ARNt sintetaze distincte, în timp ce există 31 de ARNt diferite, speculați asupra parametrilor care ar putea fi utilizați pentru a asigura că fiecare ARNt încărcat a primit aminoacidul corect.
11. Discutați dificultățile care pot apărea la conceperea unei diete pentru ameliorarea simptomelor fenilcetonuriei.
12. Persoanele cu fenilcetonurie nu pot converti fenilalanina în tirozină. De ce nu prezintă aceste persoane un deficit de tirozină?
13. Persoanele cu fenilcetonurie au adesea mai puțin pigment decât persoanele normale . Puteți sugera un motiv pentru care se întâmplă asta?
14. Depistarea precoce și respectarea unui regim alimentar strict au prevenit o mare parte din dizabilitatea intelectuală care

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

Obișnuia să apară la persoanele cu fenilcetonurie (PKU). Persoanele afectate pot duce adesea o viață normală și pot avea familii astăzi. Din diverse motive, aceste persoane tind să respecte mai puțin strict dieta pe măsură ce îmbătrânesc. Prevedeți efectul pe care l-ar putea avea asupra nou-născuților dacă mamele cu PKU nu își respectă dieta.

15. sinteza pigmenților florali este controlată de căi enzimatice biosintetice. Pentru încrucișările prezentate mai jos , postulează funcția genelor mutante și a produselor acestora în fenotipurile observate.

(a) P,: tulpină albă A x tulpină albă B
F (: tot violet
F 2 : 9/16 violet: 7/16 alb
(b) P,: alb x roz
Ft : tot violet
F 2 : 9/16 mov: 3/16 roz: 4/16 albe

16. Studiul mutanților biochimici la organisme precum *Neurospora* a arătat că unele căi metabolice sunt ramificate. Datele prezentate mai jos demonstrează natura ramificată a căii de sinteză a tiaminei .

	Supliment de creștere			
	Minim mediu	Pirimidină	Tiazol	
Mutație				Tiamină
t/w-1	–	—		+
thi-2				
thi-3				

De ce aceste date nu susțin ideea unei căi liniare? Puteți postula o cale pentru sinteza tiaminei în Neurospora *

17. conceptul o genă: o enzimă nu este considerat suficient de precis astăzi .
18. De ce poate fi interpretată o modificare a mobilității electroforetice ca o modificare a structurii primare a proteinei ?
19. Comparați componentele lanțurilor polipeptidice care alcătuiesc fiecare dintre moleculele de hemoglobină umană .
20. Folosind anemia falciformă ca studiu de caz, descrieți ce se înțelege printr-o boală moleculară sau genetică . Ce asemănări și diferențe există între acest tip de boală și o boală cauzată de un microorganism invadator?
21. Comparați contribuțiile lui Pauling și Ingram la cunoașterea bazei - genetice a anemiei falciforme .
22. Hemoglobina a doi indivizi este comparată folosind electroforeza și amprentarea moleculară . Electroforeza nu relevă nicio diferență în migrarea acesteia, dar amprentarea moleculară arată o diferență la un aminoacid. Cum este posibil acest lucru?
23. HbS provoacă anemie și rezistență la malarie , în timp ce la persoanele cu HbA, parazitul *Plasmodium falciparum* invadează celulele sanguine și provoacă malarie. Preziceți dacă persoanele cu HbC sunt susceptibile de a fi anemice și dacă vor fi rezistente la malarie.
24. Următoarele sunt diverse substituții de aminoacizi din lanțurile zy și fi ale hemoglobinei umane. Folosind tabelul cu cod genetic (Figura 13.7), determinați câte dintre

aceste substituții pot rezulta dintr-o singură modificare a nucleotidului.

Tipul de Hb	Aminoacid normal	Aminoacid substitutiv
Centrul Comercial Toronto	Către	Asp (x-5)
HbJ Oxford	Glicol	Asp (a-1S)
Hb Mexic	Gin	Glu (x-54)
Bethesda	Tyr	Al său (/f-145)
Centrul Comercial Sydney	Val	Aripă *(fl-67)*
HbM Saskatoon	Lui	Tyr(0-63)

25. Anumite mutații numite mutații *chihlimbar* la bacterii și virusuri provoacă terminarea prematură a lanțurilor polipeptidice în timpul traducerii. Multe mutații *chihlimbar au fost detectate* în diferite puncte ale genei care codifică o proteină a capului fagului T4. Cum ar putea fi investigată în continuare această problemă pentru a demonstra și susține conceptul de coliniaritate?
26. Descrieți ce înțelegeți prin coliniaritate. Care este importanța conceptului de coliniaritate în studiul geneticii?
27. Credeți că studiul lui Yanofsky cu locusul *trpA* din *E. coli* (despre care am discutat în acest capitol) oferă dovezi mai mult sau mai puțin directe în sprijinul colinearității decât studiul lui Fiers cu fagul MS2 (despre care am discutat în Capitolul 13)? Explicați răspunsul .
28. Definiți și comparați cele patru niveluri de organizare a proteinelor .
29. Enumerați cât mai multe categorii diferite de funcții ale proteinelor . Ori de câte ori este posibil , oferiți câte un exemplu pentru fiecare categorie.
30. Cum funcționează o enzimă? De ce sunt enzimele esențiale pentru organismele vii ?
31. Amestecarea exonilor este o propunere care leagă exonii ADN de repoziționarea domeniilor funcționale din proteine . Ce dovezi există care să susțină teoria amestecării exonilor ? Au apărut două școli de gândire cu privire la originea exonilor , denumite teoriile „ intronului timpuriu" și „intronului târziu" . Descrieți pe scurt ambele teorii și prezentați dovezi care să le susțină pe fiecare.

Problemas extrapicantes

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

32. Se știe că trei gene segregătoare independente controlează următoarea cale biochimică , care oferă baza culorii florilor la o plantă ipotetică:

A- g- c-
incolor ----------* galben -------* verde -------* pătat

Sunt cunoscute și trei mutații homozigote recesive, fiecare dintre ele întrerupând o etapă diferită, dintre cele menționate mai jos . Determinați caracteristicile fenotipice ale generațiilor F_t . și F2 rezultat din încrucișările P , ale plantelor de rasă pură enumerate mai jos.

(a) pătat *(AABBCC)* X galben *(AAbbCC).*
(b) galben *(AAbbCC)* X verde *(AABBcc).*
(c) fără culoare *(aaBBCC)* X verde *(AABBcc).*

33 Cum s-ar schimba rezultatul încrucișării (a) din Problema 32 dacă genele *A* Ce s-ar întâmpla dacă genele A și *B* ar fi legate și nu ar exista nicio încrucișare între ele? Cum s-ar schimba încrucișarea (a) dacă genele *A și B* ar fi legate la o distanță de 20 µm?

34 În pădurea tropicală tropicală a unei regiuni neexplorate a Americii de Sud , a fost descoperită o nouă specie de plantă care prezenta soiuri de rasă pură cu flori roz, trandafiri, portocalii și violet . Un genetician foarte perspicace, specializat în floră, a realizat o singură încrucișare și a examinat-o până la generația F2 , așa cum se arată mai jos .

Pr.	violet » roz
Ft : F2-	tot violet 27/64 violet 16/64 trandafiri 12/64 roz 9/64 portocaliu

Pe baza exclusivă a acestor date, el a putut propune un model de moștenire a pigmenților florali și o cale biochimică pentru sinteza acestor pigmenți.

Analizați cu atenție aceste date. Formulați o ipoteză care explică modelul de moștenire genetică. Apoi, propuneți o cale biochimică consistentă cu ipoteza dumneavoastră. Cum vă puteți testa ipoteza efectuând încrucișări suplimentare?

35. Apariția *tulpinilor* de Enterococcus Rezistența la antibiotice și transferul genelor de rezistență către alte bacterii patogene au crescut necesitatea unei noi generații de antibiotice pentru combaterea infecțiilor grave . Pentru a înțelege gama de situsuri potențiale de acțiune pentru antibioticele existente , schițați componentele mecanismului de translație (de exemplu, consultați pasul 3 din Figura 14.6) și utilizați o serie de markeri numerotați pentru a indica locația specifică a acțiunii antibioticului , prezentată în tabelul de mai jos .

Antibiótico	Acțiune
1. Estreptomicina 2. Cloranfenicol 3. Tetraciclina 4. Eritromicina	Se leagă de subunitatea 30S a ribozomului Inhibă peptidil transferaza ribozomului 70S. Inhibă legarea ARNt încărcat la ribozom. Se leagă de particulele 50S libere și previne formarea ribozomului 70S. Inhibă legarea ARN-ului, fm " Previne translocația prin inhibarea EF-G
5. Kasugamicina 6. Triostepton	

36. Dezvoltarea rezistenței la antibiotice la bacteriile patogene reprezintă o problemă majoră de sănătate. Evernimicina este un potențial nou antibiotic care a fost izolat din *Micromonospora carbonaceae* . Evernimicina este un oligozaharid cu activitate antibiotică împotriva unei game largi de bacterii patogene Gram-pozitive . Pentru a determina modul de acțiune al acestui medicament, cercetătorii au analizat mutanții ADN-ului ribozomal 235 care au prezentat o sensibilitate redusă la evernimicină (Adrian și colab., 2000. *Antimicrob. Ag. și Chemo.* 44:3101-06). Aceștia au descoperit două clase de mutanți care conferă rezistență: într-o clasă, mutația apare la nucleotidele 2475-2483 ale ARNr 235; în cealaltă

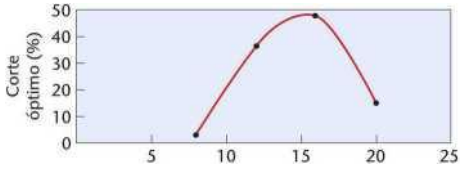
clasă, apare în proteina ribozomală L16. Acest lucru sugerează că aceste două componente ribozomale sunt înrudite structural și funcțional. Se pare că brațul anticodon al ARNt se leagă de situsul A al ribozomului la bazele 2465-2483 ale ARNr. Această constatare este în concordanță cu acțiunea propusă pentru L16, care pare a fi implicată în atragerea brațului aminoacil al ARNt către ribozom la situsul A. Folosind împreună schița mecanismului de translație din Problema 35 și aceste informații, precizați unde este probabil să se producă acțiunea antibacteriană propusă a evernimicinei .

36. Fluxul de informații genetice de la ADN la proteine este mediat de ARN mesager. Dacă se introduc segmente scurte de ADN (numite oligonucleotide antisens) complementare ARNm -urilor, se pot forma legături de hidrogen , „marcând" hibridul ADN/ARN pentru degradarea ARN-ului de către ribonucleaza H. Un studiu a comparat efectul lungimii oligonucleotidelor antisens asupra degradării mediate de ribonucleaza H a ARNm-ului factorului de necroză tumorală (TNF-κB) . *TNF-κB prezintă* atât activitate antitumorală, cât și proinflamatorie. (Lloyd și colab., 2001. *Nuc. Acid. Res. 29:* 3664-3673). Graficul de mai jos indică eficiența oligonucleotidelor antisens de diferite lungimi în provocarea degradării mediate de ribonucleaza IL -1.

(a) Descrieți cum oligonucleotidele antisens perturbă fluxul informației genetice în celulă .

(b) Ce concluzie generală se poate trage din grafic ?

(c) Ce factori sunt susceptibili să influențeze eficacitatea antisensului in vivo ? pe lângă lungimea oligonucleotidelor?



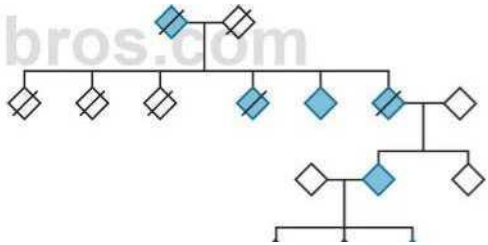
Lungimea oligonucleotidelor antisens (nt)

38. Fidelitatea translației depinde de fiabilitatea aminoacil - ARNt sintetazelor , care asigură că doar un tip de aminoacid se leagă de fiecare ARNt specific . Două afecțiuni relativ rare la om , boala Charcot-Marie-Tooth subtipul 2D (CMT2D) și atrofia musculară spinală distală de tip V (dSMA-V), sunt neuropatologii ale axonilor periferici care pot fi atribuite unei regiuni bine definite a brațului scurt al cromozomului 7, la fel ca și gena glicină ARNt sintetazei . Au fost identificate familii cu CMT2D sau dSMA-V care poartă mutații nonsens în gena glicină ARNt sintetazei ; iar mutațiile în CMT2D și dSMA-V duc la o pierdere a activității glicină ARNt sintetazei (Antonellis et al ., 2003). Prezentăm mai jos un exemplu de genealogie (din Antonellis și colab., 2003) în care , pentru a păstra anonimatul , sexele nu sunt indicate.

(a) Având în vedere următoarea genealogie și funcția generală a aminoacil ARNt sintetazelor, ați concluziona că genele care cauzează aceste boli sunt dominante sau recesive ?

(b) Având în vedere rolul vital pe care sintazele îl joacă în sinteza proteinelor, speculați despre cum ar putea supraviețui indivizii cu un astfel de defect în eficiența translațională ?

(c) De ce ar fi unele țesuturi (neuronale) mai afectate decât altele?


bros.com

15

Mutația genetică, repararea ADN-ului și transpoziția

CONCEPTE CAPITOL

Mutațiile cuprind orice modificare a secvenței perechilor de baze ale ADN-ului.

►► Mutațiile sunt o sursă de variație genetică și stau la baza selecției naturale . De asemenea, ele sunt la originea deteriorării genetice care contribuie la moartea celulară, la dezvoltarea bolilor genetice și la cancer.

Mutațiile au o gamă largă de efecte asupra organismelor, în funcție de tipul de modificare a perechilor de baze , localizarea mutației în cadrul cromozomului și funcția produsului genetic afectat .

Mutațiile pot apărea spontan ca urmare a unor procese biologice și chimice naturale sau pot fi induse de factori externi, cum ar fi substanțele chimice și radiațiile.

Mutațiile unei singure gene cauzează o mare varietate de boli la specia umană.

►► Organismele au diverse mecanisme de reparare a ADN-ului care contracarează mutațiile . Aceste mecanisme variază de la detectarea și corectarea erorilor de replicare până la repararea prin excizie de baze și recombinarea omoloagă .

Mutațiile genelor ale căror produse controlează repararea ADN-ului duc la hipermutabilitate genomică, boli de reparare a ADN-ului la oameni și cancere.

►► Geneticienii induc mutații în gene ca prim pas al analizei genetice clasice.

►► Elementele transpozabile intră și ies din cromozomi, provocând rupturi cromozomiale și inducând mutații în regiunile codificatoare și reglatoare ale genelor.

Capacitatea moleculelor de ADN de a stoca , replica, transmite și decodifica informații este baza funcției genetice. Dar la fel de importante sunt și modificările care au loc în secvențele de ADN . Fără variația care rezultă din modificările secvențelor de ADN, nu ar exista variabilitate fenotipică , nicio adaptare la schimbările de mediu și nicio evoluție. Mutațiile genetice sunt originea noilor alele și a variațiilor genetice în populații . La extrema opusă, ele sunt, de asemenea, originea modificărilor genetice care duc la moartea celulară, boli genetice și cancer.

Mutațiile oferă, de asemenea, baza pentru analiza genetică. Variabilitatea fenotipică rezultată din mutații permite geneticienilor să identifice și să studieze genele responsabile pentru trăsăturile alterate. În cercetarea genetică, mutațiile acționează ca „ markeri" pentru a identifica genele, astfel încât acestea să poată fi urmărite în timpul transmiterii de la părinți la urmași. Fără variabilitate fenotipică , analiza genetică clasică ar fi imposibilă . De exemplu, dacă toate plantele de mazăre ar avea același fenotip, Mendel nu ar fi avut nicio bază pentru cercetarea sa.

În Capitolul 8, am examinat mutațiile din regiuni cromozomiale mari - mutații cromozomiale. Mutațiile pe care le vom studia acum sunt cele care apar în principal în secvența perechilor de baze ale ADN-ului din cadrul unor gene specifice - mutații genetice . De asemenea, vom descrie modul în care celulele se apără împotriva mutațiilor folosind diverse mecanisme de reparare a ADN-ului . Acest capitol descrie, de asemenea , modul în care geneticienii folosesc mutațiile pentru a identifica genele și a analiza funcțiile acestora la oameni și la alte organisme .

15.1 Mutațiile sunt clasificate în diverse moduri

O mutație poate fi definită ca o modificare a secvenței ADN . Orice modificare a perechilor de baze oriunde în molecula de ADN poate fi considerată o mutație. O mutație poate implica substituția unei singure perechi de baze, ștergerea sau inserția uneia sau mai multor perechi de baze sau poate constitui o modificare majoră a structurii unui cromozom.

Mutațiile pot apărea în regiunile care codifică proteine ale unei gene sau în regiunile necodificatoare ale unei gene, cum ar fi intronii și secvențele reglatoare. Mutațiile pot duce la o modificare fenotipică detectabilă sau nedetectabilă . Gradul în care

 O mutație modifică caracteristicile unui organism în funcție de tipul de celulă care suferă mutația și de gradul în care mutația modifică funcția unui produs genic sau a unei regiuni genetice reglatoare.

Mutațiile pot apărea în celulele somatice sau în celulele germinale . Cele care apar în celulele germinale sunt ereditare și stau la baza diversității și evoluției genetice, precum și a bolilor genetice . Cele care apar în celulele somatice nu se transmit generației următoare, dar pot provoca modificări ale funcției celulare sau tumori.

Datorită varietății largi de tipuri și efecte ale mutațiilor , geneticienii le clasifică în mai multe moduri. Aceste scheme de organizare a mutațiilor nu se exclud reciproc. Această secțiune rezumă câteva dintre modalitățile prin care sunt clasificate mutațiile genetice .

Mutații spontane și induse

Mutațiile pot fi clasificate ca spontane sau induse, deși aceste două categorii se suprapun într-o oarecare măsură. Mutațiile spontane sunt modificări ale secvenței nucleotidice a genelor și par să nu aibă o cauză cunoscută . Nu există un agent specific asociat cu ele și, în general , se presupune că sunt accidentale. Multe dintre aceste mutații apar ca urmare a unor procese chimice sau biologice normale din organism care modifică structura bazelor azotate. Adesea , mutațiile spontane apar în timpul procesului enzimatic de replicare a ADN-ului , așa cum vom vedea mai târziu în capitol.

Spre deosebire de mutațiile spontane, mutațiile care apar din cauza influenței oricărui factor extern sunt considerate mutații induse. Mutațiile induse pot rezulta din agenți naturali sau artificiali. De exemplu, majoritatea organismelor sunt expuse la surse de energie precum radiațiile cosmice , radiațiile mineralelor și radiațiile ultraviolete de la Soare , care pot fi factori care provoacă mutații induse.

Prima demonstrație a inducerii artificiale a mutațiilor a avut loc în 1927, când Herman J. Muller a publicat că razele X pot provoca mutații la *Drosophila.* În 1928, Lewis J. Stadler a raportat că razele X au același efect asupra orzului . Pe lângă diversele tipuri de radiații, o gamă largă de agenți chimici, atât naturali, cât și artificiali , sunt cunoscuți ca fiind mutageni.

Se pot face mai multe generalizări cu privire la ratele de mutație spontană la organisme . Rata de mutație este definită ca probabilitatea ca o genă să sufere o mutație într-o singură generație .

sau la formarea unui singur gamet. În primul rând, rata mutației spontane este extrem de scăzută la toate organismele. În al doilea rând, rata variază între diferite organisme . În al treilea rând, chiar și în cadrul aceleiași specii, rata mutației spontane variază de la o genă la alta.

Genele virale și bacteriene prezintă o rată medie de mutație spontană de aproximativ 1 la fiecare 100 de milioane (10^{8}) de replicări sau diviziuni celulare (Tabelul 15.1). Porumbul, *Drosophila* și oamenii prezintă rate de mutație cu câteva ordine de mărime mai mari. Genele studiate în aceste grupuri au, în medie, între 1/1.000.000 (10^{-6}) și 1/100.000 (10^{-5}) mutații per gamet produs. Unele gene de șoarece au o rată de mutație spontană cu un ordin de mărime mai mare, între 1/100.000 și 1/10.000 (10^{-5} și 10^{-4}) . Motivele acestor variații mari ale ratei de mutație nu sunt pe deplin înțelese . Variația dintre genele unui anumit organism s-ar putea datora diferențelor inerente în mutabilitatea diferitelor regiuni ale genomului. Unele secvențe de ADN par a fi foarte susceptibile la mutații și sunt numite puncte fierbinți de mutație . Variația între organisme poate reflecta, în parte, eficiența relativă a sistemelor lor de detectare și corectare a ADN-ului . Vom discuta despre aceste sisteme mai târziu în capitol.

Testul de fluctuație: Mutațiile sunt aleatorii sau adaptive?

Unul dintre conceptele de bază din genetică este că mutațiile apar aleatoriu și nu sunt dirijate de mediul în care se află organismul - adică, mutațiile apar spontan în absența presiunilor selective, mai degrabă decât ca o consecință a acestor presiuni selective. Acest concept a fost verificat prin numeroase experimente, inclusiv testul clasic de fluctuație Luria -Delbrück .

În 1943, Salvador Luria și Max Delbrück au prezentat prima dovadă directă că mutațiile nu apar ca parte a unui mecanism adaptiv, ci au loc spontan și aleatoriu. Acest experiment , cunoscut sub numele de testul de fluctuație Luria-Delbrück , este un exemplu de muncă teoretică și analitică deosebită .

- au efectuat experimentele cu sistemul E. coli/i-Tl. Bacteriofagul TI este un virus bacterian care infectează celulele E. *coli* . și lizează bacteria infectată. În celulele E. *coli* pot apărea mutații care le fac rezistente la TI. Pentru a începe experimentul lor, Luria și Delbrück au inoculat un balon mare și o serie de eprubete individuale cu câteva celule E. *coli* . Au crescut toate culturile timp de mai multe generații în absența bacteriofagului TI. După creștere, fiecare eprubetă conținea aproximativ 20 de milioane de celule , în timp ce în balonul mare cultura a fost lăsată să crească la o densitate mai mare . În acest moment, bacteriile din eprubetele individuale mai mici au fost răspândite pe suprafața unui mediu de creștere care conținea bacteriofag TI într -o placă Petri . În mod similar , mai multe porțiuni din balonul mare (fiecare conținând, de asemenea, aproximativ 20 de milioane de celule) au fost răspândite pe un mediu pentru placă Petri care conținea , de asemenea, TI. După incubare, toate celulele individuale de E. coli care erau rezistente la bacteriofag TI au crescut și au format colonii. Toate celulele de E. *coli* rămase , că

TABELUL 1S.1 Rate de mutație spontană la diferite loci ale diferitelor organisme.

Corp	Caracter	General	Rată*****
Bacteriofag T2	Inhibarea lizei	r—>r'	1 x 10 *
	Tipul de oaspete	*h* -*h*	4 x 10"
E. coli	Fermentația lactozei	*lac —» c-ul*	2 x 10^{7}
	Sensibilitate la streptomicină	str-d — > str-s	1 x 10 •
Zea mays	Boabele micșorate	*sh~ —+sh~*	1 x 10"
	Violet	pr* -»p<	1 x 10"
Drosophila melanogaster	Corp galben	*F*	1,2 x 10^{9}
	Ochi albi	*w* -+w*	4X 10 secunde
Mus musculus	Haină mixtă	*H.H.*	3 x 10^{5}
	Blană maro	*b ~ —> b*	8,5 x 10'
Homo sapiens	Hemofilie		2 x 10 "
	Boala Huntington	*Hu' — > Hu*	5 x 10"

*****Ratele sunt exprimate în număr de mutații per replicare genetică (T2), per diviziune celulară (*. *coli**) sau per gameți per generație (*Zea mays*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* și *Homo sapiens*).*

Nu au fost rezistente; au murit. Apoi, coloniile prezente pe plăci au fost numărate.

Logica experimentală care a permis distingerea între cele două ipoteze (mutație adaptivă sau aleatorie) a fost următoarea :

Ipoteza 1. Mutații adaptive. Dacă mutațiile s-ar produce adaptiv ca răspuns la bacteriofagul TI în mediul de cultură, toate celulele *E. coli* cultivate în mediul care conține TI ar avea o probabilitate constantă de a dobândi o mutație care conferă rezistență la TI. Prin urmare, numărul de celule rezistente (colonii) ar depinde doar de numărul de celule *E. coli și bacteriofagi prezenți în plăcile Petri. În acest caz, deoarece un număr constant de celule și fagi TI au fost prezenți în fiecare placă,* ar trebui observat un număr relativ constant de colonii rezistente în toate plăcile și în toate experimentele.

Ipoteza 2. Mutații aleatorii. În schimb, dacă mutațiile apar aleatoriu și nu sunt afectate de prezența sau absența bacteriofagului, mutațiile care conferă rezistență la bacteriofag s-ar produce cu o rată scăzută în orice moment al incubării, chiar și în absența bacteriofagului TI. Dacă o mutație apare la începutul procesului de incubare în eprubete, creșterea ulterioară a bacteriilor mutante ar produce un număr mare de celule rezistente în cultură. Dacă o mutație ar apărea mai târziu în timpul procesului de incubare , ar exista mai puține colonii rezistente. Ipoteza mutațiilor aleatorii prezice că numărul de celule rezistente ar fluctua de la experiment la experiment și de la eprubetă la eprubetă, reflectând momentele variabile la care mutațiile care conferă rezistență la fagi au apărut în cultura lichidă. În schimb, fiecare porțiune a balonului de cultură (care conține un amestec omogen de celule rezistente și sensibile) ar produce un număr constant de colonii rezistente pe toate plăcile.

Tabelul 15.2 prezintă un set de date reprezentativ din experimentele Luria-Delbrück. Coloana din mijloc arată numărul de colonii mutante recuperate dintr-o serie de alicote prelevate din cultura lichidă din balon. Aceste date servesc drept control și, așa cum s-a prevăzut, se observă o fluctuație mică în aceste probe. În schimb, coloana din dreapta arată numărul de colonii rezistente - recuperate din 10 dintre culturile lichide incubate independent. Aceste date relevă o fluctuație mare între culturile incubate independent, susținând ipoteza că mutațiile apar aleatoriu, chiar și în absența presiunii selective, și sunt moștenite stabil.

TABELUL 15.2 **Experimentul Luna-Delbrück demonstrează că mutațiile sunt spontane**

	Numărul de bacterii rezistente la T1	
Numărul eșantionului	Aceeași cultură (control)	Diferite culturi
1	14	6
2	15	5
3	13	10
4	21 de ani	8
5	15	24
6	14	13
7	26.165	
8	16	15
9	20	6
10	13	10
Media	16,7	26.2
Varianță	15.0	2.178,0

Sursa: Luria y Delbrück (1943).

Deși conceptul de mutație spontană a fost acceptat de mult timp, posibilitatea ca organismele să poată induce și mutații specifice ca urmare a presiunilor de mediu a continuat să intrige geneticienii. Unele cercetări recente și controversate au sugerat că, în anumite condiții de stres nutrițional , cum ar fi postul, bacteriile ar putea fi capabile să activeze mecanisme care generează o stare de hipermutabilitate a genelor , care, odată mutate, le-ar crește supraviețuirea . Concluziile acestor studii sunt încă o sursă de dezbatere, dar mențin viu interesul pentru posibilitatea mutației adaptive .

Clasificare în funcție de localizarea mutației

Mutațiile pot fi clasificate în funcție de tipul de celulă sau de localizarea cromozomială în care apar . Mutațiile somatice sunt cele care apar în orice celulă a corpului , cu excepția celulelor germinale. Mutațiile autosomale apar în genele situate pe autozomi, în timp ce mutațiile legate de X și Y apar în genele situate pe cromozomul X sau Y.

Mutațiile care apar în celulele somatice nu se transmit generațiilor ulterioare . Atunci când apare o mutație autozomal recesivă într -o celulă somatică a unui organism diploid, este puțin probabil să aibă vreun rezultat fenotipic detectabil . Expresia majorității acestor mutații este probabil mascată de exprimarea alelei de tip sălbatic din cadrul acelei celule. Mutațiile somatice vor avea un impact mai mare dacă sunt dominante sau, la bărbați, dacă sunt legate de X, deoarece aceste mutații sunt mai susceptibile de a fi exprimate imediat .

În mod similar, impactul va fi mai mare dacă mutația somatică dominantă sau legată de X apare la începutul dezvoltării, când un număr mic de celule nediferențiate se replică pentru a da naștere diferitelor țesuturi și organe diferențiate. Adesea, mutațiile dominante care apar în celulele țesuturilor adulte sunt mascate de miile de celule non-mutante din același țesut care îndeplinesc funcții normale.

Mutațiile celulelor germinale sunt de mare importanță deoarece pot fi transmise urmașilor prin intermediul gameților. Acestea au potențialul de a fi exprimate în fiecare celulă a unui urmaș. Mutațiile autozomal dominante moștenite vor fi exprimate în fenotipul primei generații. Mutațiile recesive legate de cromozomul X, care apar în gameții unei femele homogametice, pot fi exprimate la urmașii masculi hemizigoți. Acest lucru se va întâmpla întotdeauna deoarece urmașii masculi moștenesc cromozomul X afectat. Din cauza heterozigozității, apariția unei mutații autozomal recesive în gameții atât ai masculilor, cât și ai femelelor (chiar și a celor care produc o alelă letală) poate trece neobservată timp de mai multe generații, până când alela rezultată s-a răspândit în întreaga populație. În general, noua alelă va fi exprimată numai atunci când împerecherea aleatorie aduce împreună două copii homozigote ale acestei alele.

Clasificare în funcție de tipul de modificare moleculară

Geneticienii clasifică adesea mutațiile genetice în funcție de modificările nucleotidelor care cauzează mutația . Înlocuirea unei perechi de baze cu alta într-o moleculă de ADN se numește mutație punctuală sau substituție de baze (Figura 15.1). Schimbarea unui singur nucleotid dintr-un triplet dintr-o porțiune a unei gene care codifică proteine poate duce la un nou triplet care codifică un aminoacid diferit în produsul proteic. Dacă se întâmplă acest lucru, mutația se numește mutație missense. O a doua posibilitate este ca tripletul să se transforme într- un codon stop , rezultând terminarea translației proteinei, ceea ce este cunoscut sub numele de mutație nonsens. Dacă mutația punctuală modifică un codon, dar nu are ca rezultat o modificare a aminoacizilor în acea poziție din proteină (datorită degenerării codului genetic), aceasta poate fi considerată o mutație silențioasă.

adesea doi alți termeni folosiți pentru a descrie substituțiile de baze. Dacă o pirimidină înlocuiește o pirimidină sau o purină înlocuiește o purină, a avut loc o tranziție. Dacă o purină și o pirimidină sunt schimbate, a avut loc o transversie .

Un alt tip de modificare care poate apărea este inserarea sau ștergerea unuia sau mai multor nucleotide oriunde în genă. Așa cum este ilustrat în Figura 15.1, pierderea sau adăugarea unui singur nucleotid provoacă o modificare a tuturor codonilor ulteriori de trei litere. Aceste mutații se numesc mutații de schimbare de fază, deoarece modifică cadrul de citire al tripleților în timpul traducerii . O mutație de schimbare de fază va apărea atunci când se adaugă sau se șterge orice număr de baze, cu excepția multiplilor de trei, care vor restabili cadrul de citire inițial. Unul dintre numeroasele tripleți alterați este probabil UAA, UAG sau UGA - codonii stop ai traducerii. Când se întâlnește unul dintre acești tripleți în timpul traducerii, sinteza polipeptidelor este terminată . Evident, consecințele mutațiilor de schimbare de fază pot fi foarte grave, mai ales dacă apar aproape de începutul secvenței codificatoare.

Clasificare bazată pe efectele fenotipice

În funcție de tip și locație , mutațiile pot avea o gamă largă de efecte fenotipice, de la zero până la extrem de severe.

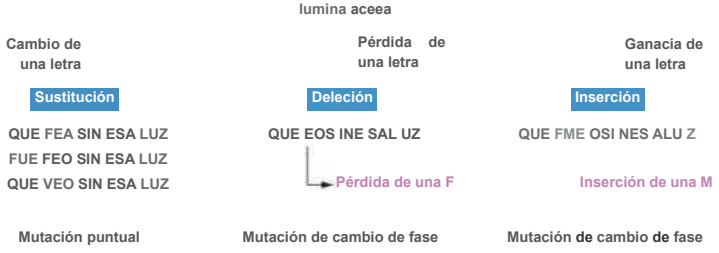


FIGURA 15.1 Analogia efectelor substituției, ștergerii *și* inserării unei litere într-o sintagmă formată din cuvinte din trei litere, demonstrând mutații punctuale *și* schimbări de fază sau model de citire.

Așa cum s-a discutat în Capitolul 4, o mutație cu pierdere de funcție este una care reduce sau elimină funcția unui produs genetic. Orice tip de mutație, de la o mutație punctuală până la o deleție a întregii gene, poate duce la o pierdere de funcție. Aceste mutații care duc la o pierdere completă a funcției sunt cunoscute sub numele de mutații nule. Majoritatea mutațiilor cu pierdere de funcție sunt recesive; cu toate acestea, o mutație cu pierdere de funcție poate avea un efect dominant atunci când apare o afecțiune cunoscută sub numele de haploinsuficiență . La organismele diploide, haploinsuficiența apare atunci când singura copie funcțională a genei nu produce suficient produs genetic pentru a provoca exprimarea unui tip sălbatic. La om, sindromul Marfan este un exemplu de tulburare cauzată de haploinsuficiență - în acest caz, ca urmare a unei mutații cu pierdere de funcție într-o copie a genei FBN1 .

O mutație cu câștig de funcție are ca rezultat un produs genetic cu funcții îmbunătățite sau noi. Aceasta se poate datora unei modificări a aminoacizilor din secvența proteică, care conferă o nouă activitate, sau poate rezulta dintr-o mutație în regiunea de reglare a genei, care duce la o expresie genică crescută sau la sinteza produsului genetic la un moment sau o locație anormală. Majoritatea mutațiilor cu câștig de funcție sunt dominante .

Cele mai ușor de observat mutații sunt cele care afectează o trăsătură morfologică. Aceste mutații sunt cunoscute și sub denumirea de mutații observabile și sunt recunoscute prin capacitatea lor de a modifica fenotipul normal sau de tip sălbatic. De exemplu, toate trăsăturile specifice speciei de mazăre Mendel și multe dintre variațiile genetice găsite la *Drosophila* se încadrează în această denumire, deoarece provoacă modificări evidente în morfologia organismului .

Unele mutații prezintă efecte nutriționale sau biochimice. La bacterii și ciuperci, o mutație nutrițională tipică este incapacitatea de a sintetiza un aminoacid sau o vitamină. La oameni, hemofilia și anemia falciformă sunt exemple de boli cauzate de mutații biochimice. Deși aceste mutații nu afectează întotdeauna caracteristicile morfologice, ele afectează funcția proteinelor , ceea ce poate avea un impact asupra bunăstării și supraviețuirii individului afectat.

O altă categorie o reprezintă mutațiile care afectează tiparele comportamentale ale unui organism. Principalul efect al mutațiilor comportamentale este adesea dificil de analizat . De exemplu, comportamentul de împerechere al musculiței de fructe poate fi afectat dacă aceasta nu poate bate din aripi. Cu toate acestea, defectul ar putea fi la nivelul mușchilor de zbor, al nervilor care îi inervează sau al creierului , de unde provin impulsurile nervoase care inițiază mișcarea aripilor .

Un alt grup de mutații — mutațiile reglatoare — afectează reglarea expresiei genelor . O mutație într- o genă reglatoare sau într -o regiune care controlează gena poate perturba procesele normale de reglare și poate activa sau dezactiva în mod necorespunzător expresia genelor . De exemplu , așa cum vom vedea în discuția despre operonul *lac* din Capitolul 16, o genă reglatoare produce un produs care controlează transcripția operonului *lac* . complet . Mutațiile din cadrul acestei gene reglatoare pot duce la producerea unei proteine reglatoare cu efecte anormale asupra operonului *lac* .

Înțelegerea noastră asupra reglării genelor s-a bazat în mod tradițional pe studiul mutațiilor reglatoare . Mutațiile reglatoare pot apărea și în regiuni precum joncțiunile de splicing , promotorii și alte regiuni reglatoare ale unei gene, care pot afecta multe aspecte ale reglării genelor , inclusiv inițierea transcripției , splicing- ul ARNm și stabilitatea ARNm .

De asemenea, este posibil ca o mutație să perturbe un proces esențial pentru supraviețuirea organismului. În acest caz, se numește mutație letală. De exemplu, o bacterie mutantă care și-a pierdut capacitatea de a sintetiza un aminoacid esențial se va opri din creștere dacă se află într - un mediu care nu conține acel aminoacid și , în cele din urmă , va muri. Mai multe boli biochimice ereditare la oameni sunt, de asemenea, exemple de mutații letale. De exemplu, boala Tay -Sachs și boala Huntington sunt cauzate de mutații care duc la letalitate, dar în momente diferite ale ciclului de viață uman .

Un alt tip interesant de mutație este cel care afectează organismul în moduri care depind de mediul său . Aceste mutații sunt numite mutații condiționate deoarece, deși mutația este prezentă în genomul organismului , aceasta poate fi detectată doar în anumite condiții . Mutațiile sensibile la temperatură sunt printre cele mai bune exemple de mutații condiționate . La o temperatură „ permisivă ” , produsul genetic mutant funcționează normal , dar își pierde funcționalitatea la o temperatură „restrictivă”. Astfel, atunci când organismele trec de la o temperatură permisivă la una restrictivă , efectul mutației devine evident . Variațiile de culoare a blănii sensibile la temperatură la pisicile de șapte luni și iepurii himalayeni, discutate în Capitolul 4 , sunt exemple excelente ale efectelor mutațiilor sensibile la temperatură .

O mutație neutră este o mutație care poate apărea într- o regiune care codifică o proteină sau în orice parte a genomului și al cărei efect asupra sănătății genetice

Efectul unei mutații asupra organismului este neglijabil. De exemplu, o mutație neutră în cadrul unei gene ar putea schimba un codon de lizină (AAA) într-un codon de arginină (AGA). Cei doi aminoacizi sunt similari din punct de vedere chimic; prin urmare, această modificare poate fi nesemnificativă pentru funcția proteinei. Deoarece genomurile eucariote sunt compuse în principal din regiuni necodificatoare, marea majoritate a mutațiilor vor apărea probabil în genomul care nu conține gene. Acestea pot fi considerate mutații neutre, cu condiția să nu afecteze produsele genetice sau expresia genelor.

ACUM REZOLVĂ ASTA

15.1 Dacă apare o mutație spontană în genomul unei celule ovariene umane și această mutație schimbă un A într- un T, care este cel mai probabil efect al acestei mutații asupra fenotipului unui urmaș care se dezvoltă din acest ovar cu pereți ?

SUGESTIE: *Această problemă ne cere să prezicem efectele pe care o mutație a unei singure perechi de baze le va avea asupra fenotipului . Cheia rezolvării acesteia implică înțelegerea organizării genomului uman, precum și a efectelor pe care mutațiile le au asupra regiunilor codificatoare și necodificatoare ale genelor , precum și a efectelor mutațiilor asupra dezvoltării.*

15.2

Mutațiile spontane apar din erori de replicare și modificarea bazelor

În această secțiune, vom schița câteva dintre procesele care duc la mutații spontane. Este util să ne amintim că multe dintre modificările ADN-ului care apar în timpul mutagenezei spontane se întâmplă, de asemenea, într-un ritm mai rapid, în timpul mutagenezei induse .

Erori de replicare a ADN-ului și alunecare

După cum am văzut în Capitolul 11, procesul de replicare a ADN-ului este imperfect. Ocazional, ADN polimerazele inserează nucleotide incorecte în timpul replicării unei catene de ADN . Deși ADN polimerazele pot corecta majoritatea acestor erori de replicare folosind capacitățile lor inerente de corectare a erorilor prin activitatea exonucleazică 3' - 5', nucleotidele încorporate incorect pot persista după replicare . Dacă mecanismele de reparare a ADN-ului nu detectează și nu corectează aceste erori, ele pot duce la mutații. Faptul că bazele pot adopta diverse forme, cunoscute sub numele de tautomeri, crește, de asemenea, probabilitatea apariției unor împerecheri nepotrivite în timpul replicării ADN-ului, așa cum vom explica mai jos.

Pe lângă nepotriviri și mutații punctuale , replicarea ADN-ului poate introduce și mici inserții sau deleții. Aceste mutații pot apărea atunci când catena șablon de ADN formează o buclă și alunecă în timpul replicării sau când ADN polimeraza alunecă sau se blochează în timpul replicării . Dacă apare o buclă în catena șablon în timpul replicării , ADN polimeraza poate sări peste nucleotidele prezente în buclă, introducând o mică deleție în noua catena. Dacă ADN polimeraza introduce în mod repetat nucleotide care nu sunt prezente în catena șablon, vor fi inserate una sau mai multe nucleotide, creând o buclă nepereche în catena nou sintetizată . Inserțiile și delețiile pot duce la mutații de schimbare a cadrului de citire sau la adăugiri sau deleții de aminoacizi în produsul genic.

Alunecarea în timpul replicării poate apărea oriunde în ADN, dar se pare că există o preferință clară pentru regiunile care conțin secvențe repetate. Secvențele repetate sunt puncte fierbinți pentru mutația ADN-ului și, în unele cazuri, contribuie la boli moștenite , cum ar fi sindromul X fragil și boala Huntington . Hipermutabilitatea secvențelor repetate în regiunile necodificatoare ale genomului este, de asemenea, baza metodelor actuale de analiză criminalistică a ADN-ului .

Modificări tautomerice

Purinele și pirimidinele pot adopta forme tautomerice - adică forme chimice alternative care diferă doar prin deplasarea unui singur proton în cadrul moleculei. Tautomerii importanți din punct de vedere biologic includ formele ceto-enol ale timinei și guaninei și formele amino-imino ale citozinei și adeninei. Aceste modificări - modifică structura de legătură a moleculei, permițând formarea de legături de hidrogen cu baze necomplementare. Astfel, modificările tautomerice pot produce modificări în împerecherea bazelor și mutații. Figura 15.2 compară relațiile normale de împerechere a bazelor cu împerecheri rare, neortodoxe. După cum se poate observa, se pot forma împerecheri anormale T=G și C = A , printre altele .

replicării ADN-ului atunci când un tautomer format tranzitoriu pe catena șablon se împerechează cu o bază necomplementară . În următorul ciclu de replicare, membrii perechii de baze nepotrivite se separă , iar fiecare își specifică baza complementară normală. Rezultatul final este o mutație punctuală (Figura 15.3).

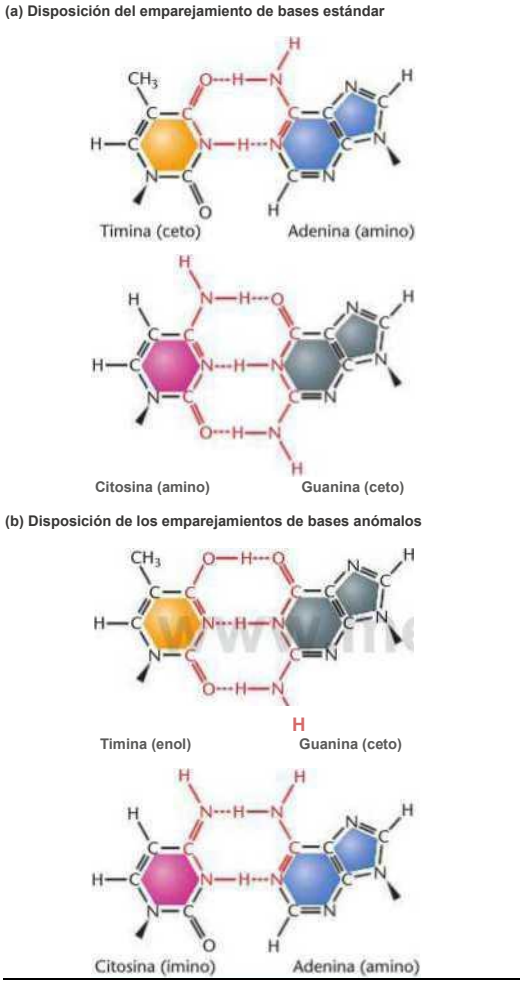


FIGURA 15.2 Relații standard de împerechere a bazelor (a) comparativ cu exemple de împerecheri anormale de baze produse ca urmare a modificărilor tautomerice (b). Vârfurile săgeților indică locurile în care baza se leagă de zahărul pentozidic.

Depurinarea și dezaminarea

Unele dintre cele mai frecvente cauze ale mutațiilor spontane se datorează a două forme de deteriorare a bazelor ADN-ului : depurinarea și deaminarea. Depurinarea implică pierderea bazelor azotate dintr-o moleculă de ADN bicatenar intactă. Cel mai adesea, baza este o purină, fie guanină, fie adenină. Aceste baze se pot pierde dacă legătura glicozidică care leagă 1' -C al dezoxiribozei de poziția 9 a inelului purinic se rupe, lăsând un situs apurinic pe o catenă de ADN . Geneticienii estimează că mii dintre aceste leziuni spontane se formează zilnic în ADN-ul celulelor de mamifere cultivate. Dacă

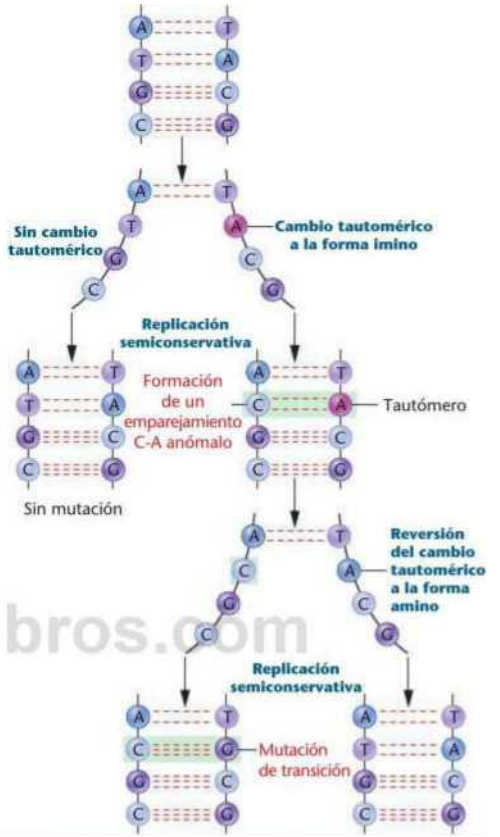


FIGURA 15.3 Formación de una mutación de transición de A = TaG = C como consecuencia de un cambio tautomérico en la adenina.

situsurile apurinice nu sunt reparate, nu va exista nicio bază în acea poziție care să servească drept șablon în timpul replicării ADN-ului . În consecință , ADN polimeraza poate insera un nucleotid aleatoriu în acel situs .

În procesul de dezaminare, o grupare amino a adeninei sau citozinei este transformată într-o grupare ceto.

(Figura 15.4). În aceste cazuri, citozina este convertită în uracil , iar adenina în hipoxantină. Cel mai important efect al acestor modificări este modificarea specificității de împerechere a acestor două baze în timpul replicării ADN-ului . De exemplu, citozina se împerechează în mod normal cu guanina. După conversia sa în uracil, care se împerechează cu adenina, perechea originală G = C devine o pereche A = U și , după un alt ciclu de replicare , o pereche A = T. Când adenina este dezaminată, perechea originală A = T devine o pereche G ■ C , deoarece hipoxantina se împerechează în mod natural cu citozina. Deaminarea poate apărea spontan sau ca urmare a tratamentului cu mutageni chimici , cum ar fi acidul azotos (HNO_2) .

Leziuni oxidative

ADN-ul poate fi, de asemenea, deteriorat de produși secundari ai proceselor celulare normale . Acești produși secundari includ diverse tipuri de oxigen reactiv (oxidanți electrofili) generați în timpul respirației aerobe normale. De exemplu, superoxidul (O_2^-), radicalii hidroxil ($^{\cdot OH}$) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2), care sunt generați în timpul metabolismului celular, amenință constant integritatea ADN-ului. Astfel de oxidanți reactivi, care sunt generați și prin expunerea la radiații de înaltă energie, pot produce peste 100 de tipuri diferite de modificări chimice ale ADN-ului, inclusiv modificări ale bazelor , pierderea bazelor și rupturi monocatenare.

Transpozoni

Elementele genetice transpozabile, sau transpozonii, sunt elemente de ADN care se pot deplasa în cadrul unui genom sau între genomuri. Aceste elemente sunt prezente în genomurile tuturor organismelor, de la bacterii la oameni, și adesea cuprind porțiuni mari din aceste genomuri. Transpozonii pot acționa ca mutageni naturali. Dacă, la mutarea într-o nouă locație, se inserează în regiunea codificatoare a unei gene, pot modifica cadrul de citire sau pot introduce codoni stop. Dacă se inserează în regiunea reglatoare a unei gene, pot perturba exprimarea corectă a genei respective. Transpozonii pot provoca, de asemenea, leziuni cromozomiale.

ACUM REZOLVĂ ASTA

15.2 Unul dintre cele mai faimoase cazuri de mutație recesivă legată de cromozomul X la om este hemofilia, care a afectat descendenții reginei Victoria a Angliei . Genealogia familiei regale indică faptul că Victoria a fost heterozigotă pentru această trăsătură ; cu toate acestea, tatăl ei nu a fost afectat și nu există dovezi că mama ei a fost purtătoare. Ați putea enumera câteva explicații posibile pentru modul în care a apărut această mutație? Ce tipuri de mutații ar putea cauza această boală?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să determinăm sursele noilor mutații . Cheia rezolvării ei constă în luarea în considerare a modurilor în care apar mutațiile, a tipurilor de celule în care acestea pot apărea și a modului în care sunt moștenite.*

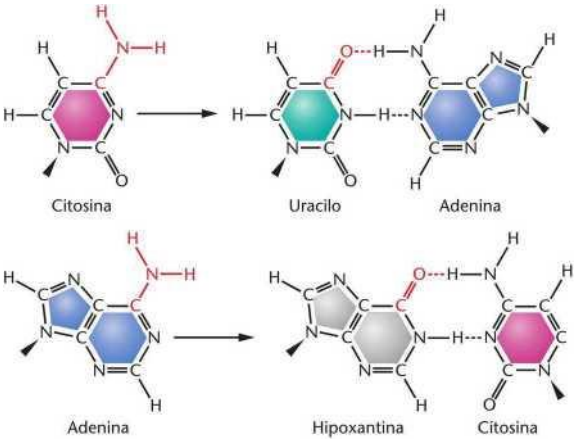


FIGURA 15.4 Deaminarea citozinei și adeninei, rezultând noi împerecheri de baze și mutații. Citozina este convertită în uracil, care se împerechează cu adenina. Adenina este convertită în hipoxantină, care se împerechează cu citozina.

inclusiv rupturi dublu catenare, inversiuni și translocații . Elementele genetice transpozabile sunt descrise în detaliu mai târziu în acest capitol (Secțiunea 15.8).

15.3

Mutațiile induse apar din cauza deteriorării ADN-ului cauzate de agenți chimici și radiații.

Mutațiile induse sunt cele care cresc rata de mutație peste valoarea sa spontană. Toate celulele de pe Pământ sunt expuse la un număr vast de agenți numiți mutageni, care au potențialul de a deteriora ADN-ul și de a provoca mutații induse. Unii dintre acești agenți, cum ar fi anumite toxine fungice, razele cosmice și lumina ultravioletă, sunt componente naturale ale mediului nostru. Alții, inclusiv unii poluanți industriali, razele X utilizate în medicină și substanțele chimice din fumul de tutun, pot fi considerați adaosuri nenaturale sau produse de om la lumea modernă. Din punct de vedere pozitiv, geneticienii folosesc unii mutageni pentru a analiza genele și funcțiile acestora, așa cum vom vedea mai târziu în acest capitol (Secțiunea 15.7). Mecanismele prin care unii dintre acești agenți naturali și nenaturali duc la mutații sunt rezumate mai jos .

Analogi de bază

O categorie de mutageni chimici sunt analogii de baze, componente care pot înlocui purinele sau pirimidinele în timpul biosintezei acidului nucleic . De exemplu, 5-bromouracilul (5-BU), un derivat de uracil , se comportă ca un analog de timină și este halogenat în poziția 5 a inelului pirimidinic . Dacă 5 -BU este legat chimic de dezoxiriboză , se formează nucleozida analogă bromodeoxiuridină (BrdU) . Figura 15.5 compară structura acestui analog cu cea a timinei. Prezența atomului de brom în locul grupării metil crește probabilitatea unei deplasări tautomerice. Dacă 5-BU este încorporat în ADN în locul timinei și are loc o deplasare tautomerică la forma enol, 5-BU se va împerechea cu guanina. După un ciclu de replicare, va avea loc o tranziție de la A = T la G = C. În plus, prezența 5-BU în ADN crește sensibilitatea moleculei la lumina ultravioletă (UV), care este, de asemenea, mutagenă.

Există și alți analogi de bază care sunt mutageni. De exemplu, 2-aminopurina (2-AP) poate acționa ca

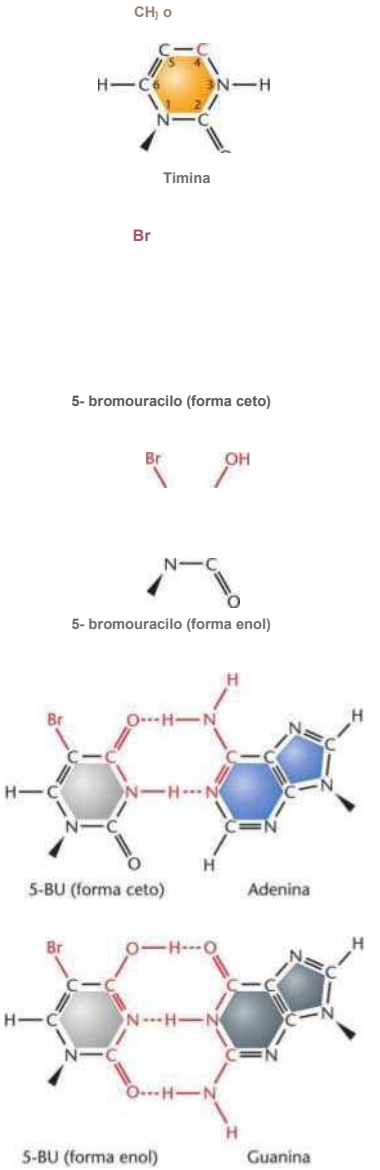


FIGURA 15.5 Similitudes entre la estructura química del 5-bromouracilo (5-BU) y la timina. En la forma ceto más común, 5-BU se empareja con adenina, comportándose como un análogo de la timina. En la forma enol menos frecuente, se empareja de manera anómala con la guanina.

analog al adeninei . Pe lângă afinitatea sa de împerechere cu timina , 2-AP se poate împerechea și cu citozina, ceea ce, după replicare, duce la posibila tranziție de la A = T la G = C.

Agenți alchilanți, intercalanți și formatori de aducti

O serie de substanțe chimice naturale sau artificiale modifică structura ADN-ului și provoacă mutații. Gazele iperită cu sulf, descoperite în timpul Primului Război Mondial, se numără printre primii mutageni chimici identificați în studiile războiului chimic. Gazele iperite sunt agenți de alchilare; adică donează grupări alchil precum CH_2 sau CH_2CH_2 grupărilor amino sau ceto ale nucleotidelor. De exemplu, etilmetansulfonatul (EMS) alchilează grupările ceto la pozițiile 6 ale guaninei și 4 ale timinei. Ca și în cazul analogilor de baze, afinitățile de împerechere sunt modificate, provocând mutații de tranziție. De exemplu, 6 -etilguanina este un analog de bază al adeninei și se împerechează cu timina (Figura 15.6).

Agenții intercalanți sunt substanțe chimice cu dimensiuni și forme care le permit să se insereze între perechile de baze ale ADN-ului. Atunci când sunt încorporați între perechile de baze, agenții intercalanți provoacă distorsiunea și desfășurarea lanțurilor de ADN. Aceste modificări ale structurii ADN-ului afectează multe funcții, inclusiv transcripția, replicarea și repararea. În timpul replicării și reparării ADN-ului , au loc deleții și inserții, rezultând mutații de schimbare de fază .

Unii agenți intercalanți sunt utilizați pentru colorarea ADN-ului . Un exemplu este bromura de etidiu , un compus fluorescent utilizat în mod obișnuit în laboratoarele de biologie moleculară pentru vizualizarea ADN-ului în timpul purificărilor și electroforezei pe gel. Caracteristicile mutagene atât ale bromurii de etidiu , cât și ale luminii ultraviolete utilizate pentru vizualizarea fluorescenței sale înseamnă că această substanță chimică trebuie utilizată cu precauție. Alți agenți intercalanți sunt utilizați pentru chimioterapia cancerului . Exemplele includ doxorubicina , utilizată pentru tratarea limfomului Hodgkin , și actinomicina, utilizată pentru tratarea diferitelor tipuri de sarcoame. Deoarece celulele canceroase se -replică ADN-ul mai frecvent decât celulele necancere, acestea sunt mai sensibile decât celulele normale la efectele mutagene dăunătoare ale acestor agenți chimioterapeutici.

Un alt grup de substanțe chimice care cauzează mutații sunt cunoscute sub numele de agenți formatori de aducti . Un aduct de ADN este o substanță care se leagă covalent de ADN, modificându-i conformația și interferând cu replicarea și repararea. Două exemple de substanțe formatoare de aducti sunt acetaldehida (o componentă a fumului de țigară) și aminele heterociclice (HCA). HCA-urile sunt substanțe chimice cancerigene create la gătitul peștelui și cărnii, cum ar fi vită sau pui. HCA-urile se formează la temperaturi ridicate din aminoacizi și creatină. Multe HCA-uri sunt legate covalent de baze guaninice. Până în prezent, până la 17 HCA-uri diferite au fost legate de dezvoltarea cancerelor, cum ar fi cancerul de stomac , colon și sân.

Lumină ultravioletă

Toate radiațiile electromagnetice sunt formate din unde de energie pe care le definim prin diferitele lor lungimi de undă (Figura 15.7). Întreaga gamă de lungimi de undă se numește spectru electromagnetic , iar energia oricărei radiații din spectru variază invers proporțional cu lungimea sa de undă. Undele din domeniul luminii vizibile și peste acestea sunt benigne atunci când interacționează cu majoritatea moleculelor organice. Cu toate acestea , undele cu lungimi de undă mai scurte decât lumina vizibilă, care sunt inerent mai energetice, au potențialul de a descompune moleculele organice. După cum știm, purinele și pirimidinele absorb radiațiile.

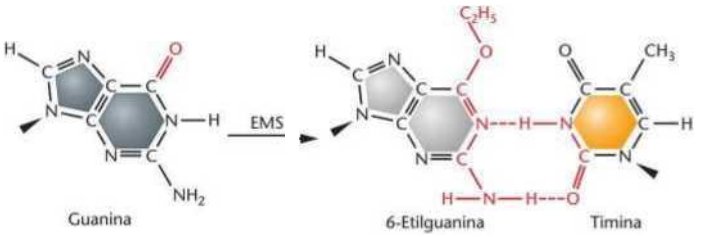


FIGURA 1 S.6 Conversia guaninei în 6-etilguanină prin intermediul agentului de alchilare etilmetan sulfonat (EMS). 6-etilguanina se împerechează cu timina.

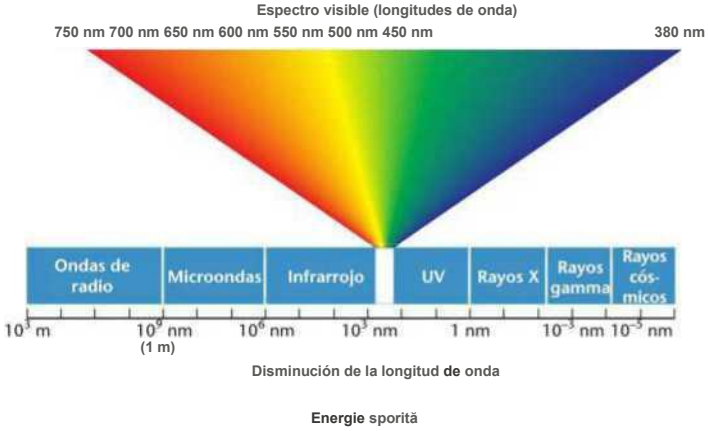
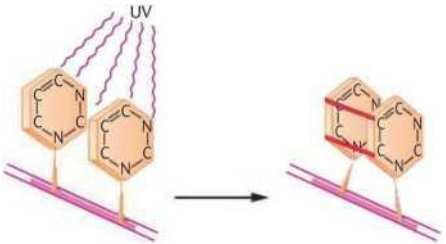


FIGURA 15.7 Regiuni ale spectrului electromagnetic și lungimile de undă asociate acestora.

Radiațiile ultraviolete (UV) sunt cele mai puternice la o lungime de undă de 260 nm. Deși stratul de ozon al Pământului absoarbe cele mai periculoase tipuri de radiații UV, o cantitate suficientă de radiații ultraviolete poate induce mii de leziuni ale ADN-ului pe oră în orice celulă expusă la aceasta. Unul dintre principalele efecte ale radiațiilor UV asupra ADN-ului este crearea de dimeri de pirimidină - substanțe chimice compuse din două pirimidine identice - în special dimeri compuși din două reziduuri de timină (Figura 15.8). Dimerii distorsionează conformația ADN-ului și inhibă replicarea normală . Rezultatul este că pot fi introduse erori în secvența de baze a ADN-ului în timpul replicării.



Dimer format între reziduurile de timină adiacente dintr -o catenă de ADN .

FIGURA 1 S.8 Inducerea unui dimer de timină prin radiații UV, ducând la distorsiunea ADN-ului. Legături covalente se formează între atomii inelului pirimidinic. Dimerizarea indusă de UV este extinsă și este responsabilă (cel puțin parțial) pentru efectele letale ale radiațiilor UV asupra celulelor.

Radiații ionizante

Așa cum am menționat anterior, energia radiației variază invers proporțional cu lungimea de undă . Prin urmare, razele X, razele gamma și razele cosmice sunt mai energetice decât radiațiile UV (Figura 15.7). În consecință, acestea pătrund mai adânc în țesuturi, provocând ionizarea moleculelor pe care le întâlnesc . Din acest motiv , acest tip de radiație se numește radiații ionizante.

Pe măsură ce radiațiile ionizante pătrund în celule , moleculele și atomii stabili sunt transformați în radicali liberi - substanțe chimice care conțin unul sau mai mulți electroni nepereche. Radicalii liberi pot afecta direct sau indirect materialul genetic, modificând purinele și pirimidinele din ADN, rupând legăturile fosfodiesterice , perturbând integritatea cromozomiilor și ducând la diverse aberații cromozomiale , cum ar fi deleții, translocații și fragmentarea cromozomiilor .

Având în vedere capacitatea radiațiilor ionizante de a provoca leziuni genetice grave , este important să se determine ce niveluri de radiații sunt mutagene la oameni și ce surse de radiații ionizante provoacă cele mai mari daune în timpul vieții de zi cu zi . Figura 15.9 prezintă un grafic al procentului de mutații letale recesive - legate de X în funcție de doza de raze X administrată .

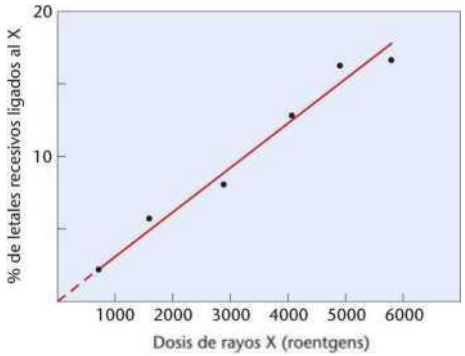


FIGURA 15.9 Graficul procentului de mutații recesive legate de X induse de doze crescânde de raze X la *Drosophila*. Dacă este extrapolată, linia intersectează axa zero, așa cum se arată pe linia punctată.

Există o relație liniară între doza de raze X și inducerea mutațiilor; de fiecare dată când doza este dublată, sunt induse de două ori mai multe mutații. Deoarece linia intersectează axa x în apropierea valorii zero, acest grafic sugerează că până și dozele foarte mici de radiații sunt mutagene.

Deși radiațiile din surse artificiale, cum ar fi deșeurile nucleare și razele X medicale, sunt adesea considerate a fi cea mai semnificativă sursă de expunere la radiații pentru oameni, datele științifice indică faptul că nu este cazul. Oamenii de știință estimează că mai puțin de 20% din expunerea la radiații la oameni se datorează surselor cauzate de om. Figura 15.10 prezintă un rezumat al expunerii anuale la radiații pentru persoanele care locuiesc în Statele Unite. După cum indică aceste date, cea mai mare expunere la radiații provine din gazul radon, razele cosmice și radioactivitatea naturală din sol. Mai mult de jumătate din expunerea la radiații cauzată de om se datorează razelor X medicale și medicamentelor radioactive.

Residuos de centrales nucleares 0,2%
Caída de armas nucleares 0,4%
H Exposición de carácter laboral 0,4% I Productos de consumo 3%
Fármacos radioactivos 3,8%
Rayos X de uso diagnòstico! 0,5% Rayos cósmicos 7,4%
9 Radioactividad del suelo 7,5%
B Isótopos naturales del cuerpo 10,3% H Gas Radón 56,5%

FIGURA 15.10 Grafic care prezintă doza medie anuală de radiații din surse naturale și umane.

Mutațiile unei singure gene cauzează o gamă largă de boli la om.

M.

Acum, că genomul uman a fost secvențiat și sunt disponibile tehnici de analiză genomică pentru a detecta genele asociate cu tulburări și mutațiile din cadrul acestora, oamenii de știință acumulează rapid informații despre modul în care fiecare tip specific de mutație contribuie la tulburări la specia umană.

Deși majoritatea bolilor genetice la om sunt poligenice - adică cauzate de variații ale mai multor gene - chiar și o singură modificare a perechii de baze într-una dintre cele aproximativ 20.000 de gene la om poate duce la o tulburare ereditară gravă . Aceste boli monogene pot fi cauzate de multe tipuri diferite de - mutații într-o singură genă. Tabelul 15.3 enumeră câteva exemple de tipuri de mutații ale unei singure gene care pot duce la boli genetice grave. Un catalog cuprinzător de gene , mutații și boli umane este disponibil în baza de date Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), care este descrisă în secțiunea „ Explorarea genomicii ” din Capitolul 3. Începând cu 2009 , baza de date OMIM catalogase peste 2.600 de fenotipuri umane pentru care se cunoaște baza moleculară .

Geneticienii estimează că aproximativ 30% din mutațiile care cauzează boli la om sunt modificări ale unei singure perechi de baze, rezultând mutații nonsens . Aceste mutații nu numai că codifică un produs proteic cu terminare prematură, dar provoacă și o degradare rapidă a ARNm. Multe alte mutații sunt mutații nonsens care modifică secvența de aminoacizi a unei proteine și mutații de schimbare de fază care modifică secvența proteinei și creează codoni interni nonsens . Alte mutații comune asociate bolilor afectează secvențele promotorilor genelor, semnalele de splicing ale ARNm și alte secvențe necodificatoare care afectează transcripția , procesarea și stabilitatea ARNm sau a proteinelor . Un studiu recent a arătat că aproximativ 15 % din toate mutațiile punctuale care cauzează boli genetice la om duc la o procesare anormală a ARNm. Aproximativ 85 % din aceste mutații de splicing modifică secvențele semnal de splicing 5' și 3'. Restul creează noi situsuri de splicing .

Ejemplos de enfermedades humanas provocadas por mutaciones en un único gen

Tipo de mutación del ADN	Enfermedad	Cambio molecular
De cambio de sentido	Acondroplasia	Glicina por arginina en la posición 380 del gen *FCFR2.*
Sin sentido	Síndrome de Marfan	Tirosina por codón de STOP en la posición 2113 del gen de la *fibrilina-1.* Diversas
Inserción	Hipercolesterolemia familiar	inserciones cortas en todo el gen *LDLR.*
Deleción	Fibrosis quis ti ca	Deleción de tres pares de bases del codón de la fenilalanina en la posición 508 del gen *CFTR.*
Expansiones por repetición de trinucleótidos	Enfermedad de Huntington	Más de 40 repeticiones de la secuencia (CAG) en la región de codificación del gen de la *Huntingtina.*

în cadrul genei. Defectele de splicing duc adesea la degradarea ARNm-ului normal sau la crearea de produse proteice anormale.

Mutații cu o singură pereche de baze și /J-talasemie

Deși unele boli genetice, cum ar fi anemia falciformă, sunt cauzate de o modificare specifică a unei perechi de baze în cadrul unei singure gene, majoritatea sunt cauzate de una dintre numeroasele mutații diferite. Profilul mutațional asociat cu β3-talasemia oferă un exemplu al modului în care o boală moștenită poate apărea dintr-un număr mare de mutații posibile.

Talasemia este o afecțiune sanguină ereditară , transmisă autosomal recesiv, rezultând dintr-o reducere sau absență a hemoglobinei. Este cea mai frecventă afecțiune monogenică din lume și afectează oamenii din întreaga lume, dar în special pe cei din zona Mediteranei, Africa de Nord, Orientul Mijlociu, Asia Centrală și Asia de Sud-Est.

Persoanele cu β1-talasemie au grade variate de anemie - de la severă la ușoară - cu simptome care includ slăbiciune, întârziere în dezvoltare, icter, organe mărite și adesea necesitatea unor transfuzii frecvente de sânge.

Mutațiile din gena *O-globinei* (*gena HBB)* cauzează J-talasemie. Gena *HBB* codifică polipeptida α-globinei, compusă din 146 de aminoacizi. Două polipeptide α-globinei se asociază cu două polipeptide α-globinei pentru a forma tetramerul de hemoglobină la adulți. Gena *HBB* se întinde pe 1,6 kilobaze pe brațul scurt al ADN-ului cromozomului 11. Este formată din trei exoni și doi introni.

Oamenii de știință au descoperit peste 250 de mutații distincte în gena *HBB* care cauzează δ-talasemie, deși majoritatea cazurilor la nivel mondial sunt asociate cu aproximativ 20 dintre aceste mutații. Majoritatea mutațiilor modifică un singur nucleotid în interiorul *sau* în apropierea genei HBB sau creează mici inserții sau deleții. În plus, fiecare populație afectată de δ - talasemie are un amestec distinct de mutații. De exemplu, cea mai răspândită mutație într-o populație din Sardinia - o mutație responsabilă pentru peste 95 % din cazuri - este o modificare a unei singure perechi de baze la codonul 39, creând o mutație nonsens și provocând terminarea prematură a polipeptidei δ-globinei . În schimb, un studiu al mutațiilor legate de δ3 -talasemie într- o populație iugoslavă a relevat 14 mutații distincte , doar trei dintre ele (toate legate de semnalele de splicing din intronul 1) fiind responsabile pentru 75 % din cazuri.

Tipurile de mutații care cauzează /J-talasemie nu afectează doar secvența de aminoacizi a jS-globinei (mutații missense, nonsens și de schimbare de fază) , ci modifică și eficiența transcripției genei HBB , maturarea și stabilitatea *ARNm* , traducerea și stabilitatea proteinelor .

Tabelul 15.4 oferă un rezumat al tipurilor de mutații monogenice care cauzează jS-talasemie. Mai mult de jumătate dintre aceste mutații sunt modificări ale unei singure perechi de baze , iar restul sunt inserții scurte , deleții și duplicații.

Mutații cauzate de repetițiile ADN-ului de expansiune

În jurul anului 1990 , analizele moleculare ale genelor responsabile pentru diverse tulburări ereditare la om au relevat o serie de observații remarcabile. Cercetătorii au descoperit că unele gene mutante conțineau expansiuni ale secvențelor de trinucleotide repetate - secvențe scurte și specifice de ADN repetate de mai multe ori . Indivizii normali au mai puțin de 30 dintre aceste secvențe ; cu toate acestea , indivizii afectați de una dintre cele peste 20 de tulburări diferite la om par să aibă un număr anormal de mare de repetiții de secvențe - adesea depășind 200 - în cadrul sau în apropierea anumitor gene.

TABLA 1S. Tipuri de mutații ale genei *HBB* care cauzează /J-talasemie.

Numărul de mutații cunoscută	a genei afectate Descriere	
22	Región corriente arriba de 5'	Se producen mutaciones de un único par de bases entre las posiciones — 101 y —25 corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por ejemplo, una transición T—>A en la secuencia TATA —30 da como resultado una transcripción reducida del gen y provoca un trastorno grave.
	Sitio CAP del ARNm	Mutación de un único par de bases (transversión A—>C) en la posición + 1, que conduce a niveles reducidos de ARNm.
	Región no traducida de 5'	Mutaciones de un único par de bases en +20, +22 y +33 que provocan reducciones en la transcripción y la traducción y trastorno de carácter leve.
7	Codón ATC de iniciación de la traducción	Mutații la o singură pereche de baze care modifică secvența AUG a ARNm, rezultând lipsa traducerii și o tulburare gravă.
36	Regiones codificantes de los exones 1, 2 y 3	Mutațiile missense și nonsens într-o singură pereche de baze creează situsuri anormale de splicing ale ARNm . Severitatea tulburării variază de la ușoară la extremă.
38 de ani	Intronii 1 și 2	Tranzițiile și transversiile într-o singură pereche de baze reduc sau previn scindarea ARNm-ului și creează situsuri de scindare anormale care afectează stabilitatea ARNm-ului. Majoritatea cauzează tulburări grave.
6	Situs de poliadenilare	Modificările unei singure perechi de baze în secvența AATAAA reduc eficiența desfășurării ARNm și a poliadenilării, rezultând ARNm lungi sau instabile. Tulburarea este ușoară.
> 100	În întreaga genă ***HBB*** și în împrejurimile sale imediate	Inserțiile, delețiile și duplicările scurte care modifică secvențele de codificare creează codoni de terminare din cauza schimbărilor de fază și perturbă splicingul ARNm.

Exemple de tulburări asociate cu aceste expansiuni repetitive de trinucleotide includ sindromul X fragil (discutat în detaliu în Capitolul 8), distrofia miotonică și boala Huntington (discutată în Capitolul 4). Atunci când repetițiile de trinucleotide, cum ar fi $(CAG)_n$, apar într -o regiune codificatoare , acestea pot fi traduse în segmente lungi de glutamină. Aceste segmente de glutamină pot determina agregarea anormală a proteinelor . Când repetițiile apar în afara regiunilor codificatoare , dar în interiorul ARNm, se consideră că ARNm acționează ca un ARN „toxic" care se leagă de proteine reglatoare importante, sechestrându-le și împiedicându -le să își îndeplinească funcțiile normale în cadrul celulei. O altă posibilă consecință a repetițiilor lungi de trinucleotide este că regiunile de ADN care conțin repetițiile pot deveni anormal metilate, ducând la reducerea la tăcere a transcripției genelor.

Mecanismele prin care secvențele repetitive se extind de la o generație la alta sunt de mare interes . Se crede că această expansiune poate rezulta din erori în timpul replicării ADN-ului sau din erori în timpul reparării ADN-ului. Indiferent de cauză, prezența acestor secvențe repetitive scurte și instabile pare a fi predominantă la oameni și la multe alte organisme.

ACUM REZOLVĂ ASTA

15.3 Medicamentul anticancerigen melfalan este un agent alchilant aparținând familiei gazului iperită . Acționează în două moduri: prin alchilarea bazelor guaninice și prin provocarea legăturilor încrucișate între lanțurile de ADN . Descrieți două moduri în care melfalanul ar putea ucide celulele canceroase . Puteți enumera două moduri în care celulele canceroase ar putea repara efectele dăunătoare ale melfalanului asupra ADN-ului?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să luăm în considerare efectul alchilării guaninei asupra împerecherii bazelor în timpul replicării ADN-ului . Cheia rezolvării acesteia este de a lua în considerare efectele mutațiilor asupra proceselor celulare care permit celulelor să crească și să se dividă. În Secțiunea 15.5, vom analiza modalitățile prin care celulele repară tipurile de mutații introduse de agenții de alchilare .*

15,5

Organismele folosesc sisteme de reparare a ADN-ului pentru a contracara mutațiile

Organismele vii au dezvoltat diverse sisteme elaborate de reparare a ADN-ului pentru a contracara deteriorarea ADN-ului care apare atât spontan , cât și prin intervenție umană. Aceste sisteme de reparare a ADN-ului sunt absolut esențiale pentru menținerea integrității genetice a organismelor și, prin urmare, pentru supraviețuirea lor pe Pământ. Echilibrul dintre mutație și reparare determină ratele de mutație observate în genele și organismele individuale. La oameni, capacitatea acestor sisteme de a contracara deteriorarea genetică este de o importanță capitală, deoarece deteriorarea netratată ar duce la boli genetice și cancer. Capitolul 19 descrie relația dintre repararea defectuoasă a ADN-ului și susceptibilitatea la cancer.

În continuare, vom trece în revistă câteva dintre sistemele de reparare a ADN-ului, subliniind principalele metode pe care organismele le utilizează pentru a contracara deteriorarea genetică.

Detectarea erorilor și repararea asocierilor incorecte

Unele dintre cele mai frecvente tipuri de mutații apar în timpul - replicării ADN-ului , atunci când ADN polimeraza inserează un nucleotid incorect. La bacterii, această enzimă (ADN polimerază III) face o greșeală la aproximativ fiecare 100.000 de inserții, ceea ce se traduce într-o rată de eroare de 10^{-10} . Din fericire, ADN polimeraza verifică fiecare pas, detectând 99% din erori. Dacă în timpul polimerizării se inserează un nucleotid incorect , enzima poate recunoaște eroarea și îi poate inversa direcția. Apoi se comportă ca o exonuclează 3'-5', eliminând nucleotidul incorect și înlocuind-o cu cel corect. Acest lucru îmbunătățește eficiența replicării de 100 de ori, rezultând un singur nucleotid nepotrivit pentru fiecare 10 inserții, reprezentând o rată de eroare finală de 10^{-10}.

Pentru a trata erori precum nepotrivirile de baze , inserțiile mici și delețiile care rămân după detectarea erorii , poate fi activat un alt mecanism, numit repararea nepotrivirilor. În timpul reparării nepotrivirilor, sunt detectate nepotrivirile , nucleotidele incorecte sunt îndepărtate, iar nucleotidele corecte sunt inserate în locul lor. Dar cum poate sistemul de reparare să recunoască care catenă este cea corectă (catena șablon) și care conține baza incorectă?

MUTATIE SCENICĂ , REPARAREA ADN-ULUI ȘI TRANSPOZIȚIA 42S (catena nou sintetizată)? Dacă eroarea este recunoscută, dar nu poate fi diferențiată, excizia ar fi aleatorie și , în 50 % din cazuri, catena cu baza corectă va fi tăiată . Prin urmare, discriminarea catenelor este un pas esențial.

proces de discriminare a fost elucidat la unele bacterii, cum ar fi *E. coli,* și se bazează pe procesul de metilare a ADN-ului. Aceste bacterii conțin o enzimă , adenin metilază, care recunoaște următoarea secvență de ADN

5'— GATC — 3'
3'— CTAG — 5'

ca substrat în timpul replicării ADN-ului și adaugă o grupare metil la fiecare dintre reziduurile de adenină .

După un ciclu de replicare , catena de ADN nou sintetizată rămâne nemetilată o perioadă de timp , deoarece metilaza este în urma ADN polimerazei. Înainte de metilare , enzima de reparare recunoaște nepotrivirea și se leagă de catena nemetilată (nou sintetizată). O enzimă exonuclează creează o deschidere în catena de ADN nemetilată , fie 5 ' , fie 3' spre nepotrivire . O exonuclează desface și degradează catena de ADN tăiată până când ajunge la regiunea nepotrivită . În cele din urmă , ADN polimeraza umple golul creat de exonuclează , folosind catena de ADN corectă ca șablon . ADN ligaza sigilează apoi golul.

Un grup de produse genetice de *la E. coli,* MutH, MutL și - MutS, precum și exonudeazele, ADN polimeraza III și ligaza , sunt implicate în repararea nepotrivirilor . Mutațiile din genele *MutH, MutL* și *MutS* produc tulpini bacteriene deficitare în repararea nepotrivirilor . Deși mecanismele de mai sus se bazează pe studii efectuate pe *E. coli,* La drojdie și mamifere există mecanisme similare care implică proteine omoloage .

La om, mutațiile genelor care codifică proteinele de reparare a nepotrivirilor de ADN (cum ar fi hMSH2 *și* hMLH1 , Genele care sunt echivalentele umane ale genelor *MutS* și *MutL* ale *E. coli* sunt asociate cu cancerul colorectal ereditar nonpolipozic . Defectele în repararea nepotrivirilor sunt , de asemenea, frecvent întâlnite în alte tipuri de cancer , cum ar fi leucemiile , limfoamele și tumorile ovarelor, prostatei și endometrului . Celulele din aceste tipuri de cancer prezintă creșteri la nivelul întregului genom ale ratelor de mutație spontană . Legătura dintre repararea defectuoasă a nepotrivirilor și cancer este susținută de experimente pe șoareci. Șoarecii crescuți pentru a avea deficiențe în genele de reparare a nepotrivirilor acumulează ...

un număr mare de mutații și sunt predispuși la cancer.

Repararea post-replicare și sistemul de reparare SOS

Un alt sistem de reparare a ADN-ului, numit reparare post-replicativă, răspunde *după ce* ADN-ul deteriorat a scăpat de reparare și nu a putut fi replicat complet. După cum se arată în Figura 15, atunci când ADN-ul care conține orice tip de leziune (cum ar fi un dimer de pirimidină) este replicat, ADN-ul

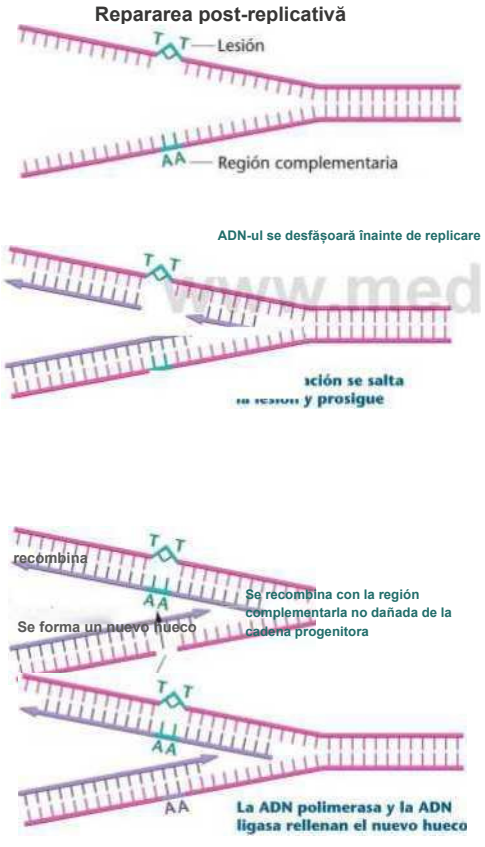

Repararea post-replicativă
T T — Lesión
A A — Región complementaria
ADN-ul se desfășoară înainte de replicare
recombina
Se recombina con la región complementarla no dañada de la cadena progenitora
Se forma un nuevo hueco
La ADN polimerasa y la ADN ligasa rellenan el nuevo hueco

FIGURA 15.11 La reparación postrepli cativa se produce sí ia replicación del AON se ha saltado una lesión, como un dímero de timina. Mediante un proceso de recombinación, se recluta la secuencia complementaria correcta de la cadena progenitora *y* se inserta en el hueco delante de la lesión. La ADN polimerasa *y* la ADN ligasa rellenan el nuevo hueco.

Polimeraza se poate opri la nivelul leziunii și o poate sări peste , lăsând un gol în catena nou sintetizată. Pentru a repara golul, proteina RecA direcționează un schimb de recombinare cu regiunea corespunzătoare a catenei parentale nedeteriorate cu aceeași polaritate (catena „donoare"). Când segmentul nedeteriorat al catenei de ADN înlocuiește segmentul deteriorat, se creează un gol în catena donatoare. Acest gol poate fi umplut prin sinteză reparativă pe măsură ce replicarea continuă. Deoarece acest tip de reparare a ADN-ului implică un eveniment de recombinare, repararea post-replicativă este numită și reparare prin recombinare omoloagă .

Există un alt sistem de reparare la E. coli, numit sistemul de reparare SOS, care răspunde, de asemenea, la deteriorarea ADN-ului, dar o face diferit. În prezența unui număr mare de nepotriviri și lacune în ADN, bacteriile pot induce expresia a aproximativ 20 de gene (inclusiv *lexA, recA* și uvr) ale căror produse permit replicarea ADN-ului chiar și în prezența acestor leziuni . Acest tip de reparare este ultima soluție pentru ADN-ul deteriorat, de unde și numele său. În timpul reparării SOS , sinteza ADN-ului devine predispusă la erori, inserând aleatoriu nucleotide potențial incorecte în locurile - unde replicarea s-ar opri în mod normal. În consecință, repararea SOS este mutagenă în sine , deși poate permite celulei să supraviețuiască deteriorării ADN-ului care altfel ar ucide-o.

Repararea prin fotoreactivare: inversarea deteriorării UV

După cum se arată în Figura 15.8, lumina UV este mutagenă ca urmare a formării dimerilor de pirimidină. Deteriorarea indusă de UV asupra ADN-ului E. *coli* poate fi parțial inversată dacă, după iradiere, celulele sunt expuse pentru scurt timp la lumină albastră din spectrul vizibil. Procesul depinde de activitatea unei proteine numite enzimă de preactivare (PRE). Enzima acționează prin tăierea legăturilor dintre dimerii de timină, inversând astfel direct efectul radiațiilor UV asupra ADN-ului (Figura 15.12). Deși enzima se asociază și cu dimerul în întuneric, trebuie să absoarbă un foton de lumină pentru a-l tăia. În ciuda capacității sale de a reduce numărul de mutații induse de UV, repararea preactivare nu este absolut necesară în E. *coli,* deoarece o mutație care generează o alelă nulă în gena care codifică PRE nu este letală. În plus, această enzimă poate fi detectată în multe organisme, inclusiv bacterii, ciuperci, plante și vertebrate - deși nu și la oameni. Oamenii și alte organisme cărora le lipsește repararea

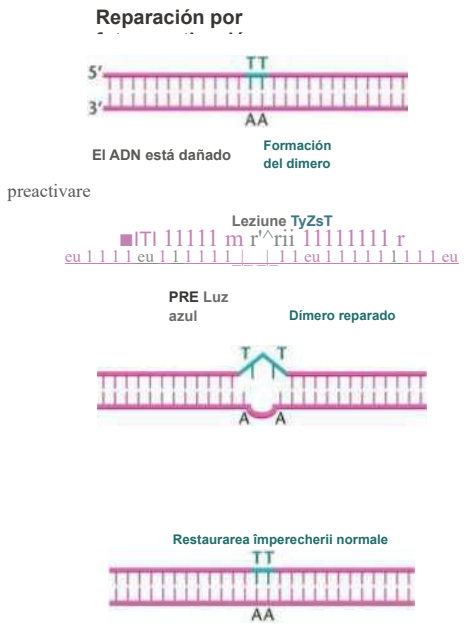


FIGURA 1 5.12 ADN deteriorat reparat prin reparare prin fotoreactivare. Enzima fotoreactivatoare (PRE), care trebuie activată de lumina albastră din spectrul vizibil, taie legătura care formează dimerul de timină.

fotoreactivare, acestea trebuie să se bazeze pe alte mecanisme de reparare pentru a inversa efectele radiațiilor UV.

Repararea prin excizie de baze și nucleotide

Sistemele de reparare a ADN-ului independente de lumină există la toate procariotele și eucariotele. Mecanismele de bază implicate în aceste tipuri de reparare, denumite colectiv reparare prin excizie, constau în următorii trei pași:

1. O nuclează recunoaște și elimină distorsiunea sau eroarea prezentă într-una dintre cele două catene ale helixului ADN. Clivajele din catena fosfodiesteric afectează în mod normal și mai multe nucleotide adiacente erorii, lăsând un gol într-una dintre catene.
2. O ADN polimerază umple golul prin inserarea de nucleotide complementare celor din catena intactă , folosind-o ca șablon de replicare. Enzima adaugă aceste nucleotide la capătul liber 3'-OH al ADN-ului tăiat. La E. *coli,* această sarcină este de obicei îndeplinită de ADN polimeraza I.

3. ligaza sigilează tăietura finală rămasă la capătul 3'-OH al ultimului nucleotid inserat , închizând astfel spațiul liber.

Există două tipuri de reparare prin excizie : repararea prin excizie a bazelor și repararea prin excizie a nucleotidelor . Repararea prin excizie a bazelor (BER) corectează ADN-ul care conține o bază ADN deteriorată. Primul pas în calea BER la E. coli implică recunoașterea bazei modificate de către o enzimă numită ADN glicozilază . Există mai multe *ADN* glicozilaze , fiecare dintre ele recunoscând o bază specifică (Figura 15.13). De exemplu, enzima uracil-ADN glicozilază recunoaște prezența uracilului în ADN . ADN glicozilazele scindează mai întâi legătura glicozidică dintre bază și zahăr, creând un situs apirimidinic sau apurinic . O enzimă numită AP endonuclează recunoaște zahărul căruia îi lipsește baza corespunzătoare . AP endonucleaza face o tăietură în catena fosfodiesterilor la situsul apirimidinic sau apurinic . Endonucleazele îndepărtează apoi zahărul dezoxiriboză, iar gaura este umplută de ADN polimerază și ADN ligază .

Deși am învățat multe despre mecanismele BER la E. *coli,* Sistemele BER au fost detectate

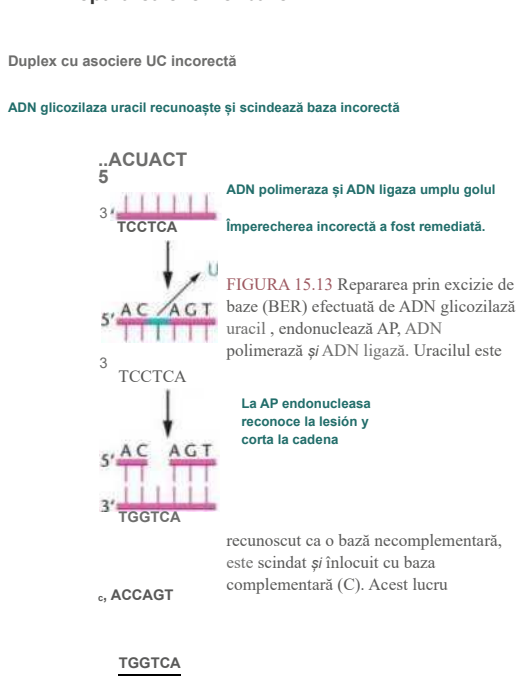
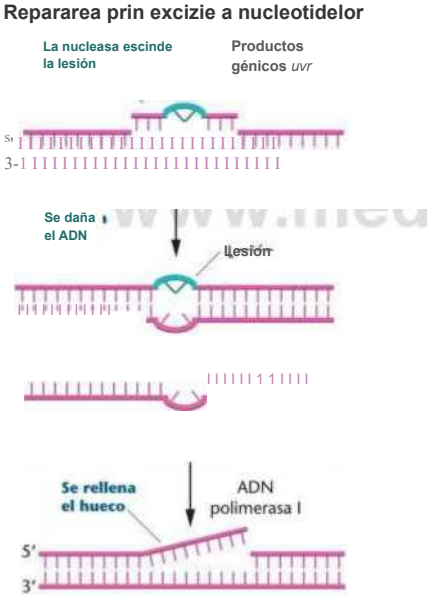


FIGURA 15.13 Repararea prin excizie de baze (BER) efectuată de ADN glicozilază uracil , endonuclează AP, ADN polimerază *și* ADN ligază. Uracilul este recunoscut ca o bază necomplementară, este scindat *și* înlocuit cu baza complementară (C). Acest lucru

se întâmplă și la eucariote, de la drojdie la oameni . Testele experimentale arată că atât celulele de șoarece, cât și cele umane care prezintă defecte în ceea ce privește activitatea BER sunt, de asemenea, hipersensibile la efectele letale ale razelor gamma și ale agenților oxidanți.

Căile de reparare prin excizie a nucleotidelor (NER) repară leziunile „voluminoase" ale ADN-ului care alterează sau distorsionează dubla helix. Aceste leziuni includ dimeri de pirimidină induși de UV și aducti de ADN, despre care am discutat anterior.

Calea NER (Figura 15.14) a fost descoperită inițial la *E. coli* de către Paul Howard-Flanders și colegii săi, care au izolat mai mulți mutanți independenți sensibili la radiațiile UV. Un grup al acestor gene a fost denumit uvr *(* reparare ultravioletă) și include mutațiile uvrA, *uvrB* și *uvrC. În calea NER,* produsele genei *uvr* sunt implicate în recunoaștere și scindare.



excizate la procariote și 28 la eucariote.

1111111111'1111111111111
1111111111111111111111111111

FIGURA 15.14 Repararea prin excizie a nucleotidelor (NER) a unui dimer de timină indus de UV. În timpul reparării, 13 nucleotide sunt

Se sella el hueco; se reestablece el emparejamiento normal

ADN ligasa

Un număr specific de nucleotide sunt de obicei tăiate de pe ambele părți ale leziunii. În *E. coli, un total* de 13 nucleotide sunt de obicei îndepărtate , inclusiv nucleotidul deteriorat. ADN polimeraza I și ADN ligaza completează apoi repararea, similar căii BER. Catena nedeteriorată complementară leziunii este utilizată ca șablon pentru replicare, completând astfel repararea.

Repararea prin excizie a nucleotidelor și bolile umane

Mecanismul de reparare prin excizie a nucleotidelor (NER) la eucariote este mult mai complex decât la procariote și implică mult mai multe proteine, codificate de aproximativ 30 de gene. Cea mai mare parte a ceea ce se știe despre acest sistem la om provine din studii detaliate ale indivizilor cu xeroderma pigmentosum (XP), o tulburare genetică recesivă rară care predispune indivizii la anomalii epidermice severe , cancere de piele și o gamă largă de alte simptome, inclusiv defecte de neurodezvoltare . Persoanele cu XP sunt extrem de sensibile la radiațiile UV de la soare . De asemenea, au o rată de cancer de 2.000 de ori mai mare decât populația generală, în special în ceea ce privește cancerul de piele. Această boală este foarte gravă și poate fi fatală, deși detectarea precoce și protejarea de lumina soarelui pot opri progresia acesteia (Figura 15.15).

Repararea leziunilor induse de UV a fost investigată in *vitro,* utilizând culturi de fibroblaste umane de la indivizi normali și afectați de XP. (Fibroblastele sunt celule nediferențiate ale țesutului conjunctiv .) Rezultatele acestor studii au sugerat că fenotipul XP este cauzat de defecte ale căii NER și de mutații în mai multe gene.

În 1968, James Cleaver a demonstrat că celulele pacienților cu XP prezentau deficiențe în mecanismele de sinteză a ADN-ului , altele decât cele utilizate în timpul replicării cromozomilor - un fenomen cunoscut sub numele de sinteză neprogramată a ADN-ului. Sinteza neprogramată a ADN-ului este activată în celulele normale de radiațiile UV. Deoarece se consideră că acest tip de sinteză reprezintă activitatea de polimerizare a ADN -ului în timpul reparării exciziei NER , lipsa sintezei neprogramate a ADN-ului la pacienții cu XP a sugerat că XP ar putea rezulta dintr-o deficiență în repararea NER .

Ideea că XP și NER sunt înrudite a fost consolidată și mai mult de studii care au utilizat hibridizarea celulelor somatice . Când fibroblastele de la doi pacienți cu XP fără legătură sunt cultivate împreună , acestea pot fuziona , formând heterocarioni . Un heterocarion este o singură celulă cu doi nuclei de la organisme diferite .

FIGURA 1 S.1 S Două persoane cu xerodermie pigmentoasă. Băiatul de 4 ani din stânga prezintă leziuni cutanate clare induse de soare. Sunt vizibile pete roșiatice (eritem) și modificări neregulate ale pigmentării ca răspuns la leziunile celulare. Are două tipuri de cancer nodular pe nas. Fata de 18 ani din dreapta a fost protejată cu atenție de lumina soarelui de când a fost diagnosticată cu xerodermie pigmentoasă în copilărie. I s-au îndepărtat mai multe tipuri de cancer și a putut lucra ca model.

diferite, dar cu o citoplasmă comună. Activitatea NER în heterocarion poate fi măsurată prin observarea nivelului de sinteză neprogramată a ADN-ului. Dacă mutația din fiecare dintre cele două celule XP a avut loc în aceeași genă, heterocarionul, la fel ca celulele care au fuzionat pentru a-l forma, nu va putea efectua repararea NER. Acest lucru se datorează faptului că heterocarionul nu va avea nicio copie normală a acelei gene. Cu toate acestea, dacă heterocarionul efectuează repararea NER, mutația din cele două celule XP trebuie să fie prezentă în două gene diferite. În acest caz, se spune că cei doi mutanți prezintă complementare , un concept explicat în Capitolul 4. Complementarea are loc deoarece heterocarionul are cel puțin o copie normală a fiecărei gene în celula fuzionată. Prin fuzionarea celulelor XP de la un număr mare de pacienți cu XP , cercetătorii au putut determina câte gene contribuie la fenotipul XP.

Pe baza acestor studii și a multor altor studii, pacienții cu XP au fost clasificați în șapte grupe de complementare , ceea ce indică faptul că cel puțin șapte gene diferite sunt implicate în repararea prin excizie a nucleotidelor la om. În prezent, a fost identificată o genă care reprezintă fiecare dintre aceste șapte grupe de complementare , XPA *la* XPG *(* genele A la genele G din Xeroderma Pigmentosa), împreună cu omologii corespunzători de drojdie. Aproximativ 20 % dintre pacienții cu XP nu aparțin niciunuia dintre aceste șapte grupe de complementare . Celulele acestor pacienți prezintă adesea mutații în gena care codifică ADN polimeraza H și sunt defecte în ceea ce privește mecanismele de sinteză a ADN-ului pentru reparare .

Ca urmare a studierii genelor defecte din XP, se cunosc acum multe despre modul în care NER contracarează deteriorarea ADN-ului în celulele normale. La om , primul pas este recunoașterea ADN-ului deteriorat de către proteinele codificate de *genele XPC, XPE și XPA.* Aceste proteine *recrutează* apoi celelalte proteine implicate în acest proces de reparare la locul ADN-ului deteriorat. Genele XPB și XPD codifică helicaze *,* iar genele *XPF* și XPG *codifică* nucleazele . Complexul de reparare prin excizie, care conține acești factori și alții , este responsabil pentru excizarea unui fragment de 28 de nucleotide din catena *de* ADN care conține leziunea.

Alte două tulburări autozomal recesive rare sunt asociate cu defecte ale căii NER : sindromul Cockayne (CS) și tricotiodistrofia (TTD). Simptomele SC includ probleme fizice și de neurodezvoltare și sensibilitate la lumina soarelui , dar nu este caracterizat printr -o predispoziție la cancer. Pacienții cu SC îmbătrânesc prematur și de obicei mor înainte de vârsta de 20 de ani. Pacienții cu TTD suferă de nanism, dizabilitate intelectuală, piele și păr fragile și deformări faciale . La fel ca SC, acești pacienți sunt sensibili la lumina soarelui, dar nu au rate de cancer mai mari decât în mod normal. Pacienții cu TTD au o speranță de viață de șase ani.

Atât CS , cât și TTD rezultă din mutații în unele dintre aceleași gene implicate în XP (cum ar fi XPB și XPD), precum și în alte gene care codifică proteine implicate în mecanismul NER în regiunile transcrise ale genomului. Nu se știe de ce o varietate atât de largă de simptome distincte apare din cauza mutațiilor în aceleași gene în căile de reparare a ADN-ului; cu toate acestea , acest lucru poate reflecta faptul că produsele multor gene NER sunt implicate și în alte procese esențiale.

Repararea rupturilor duble catenare la eucariote

Până acum, ne-am concentrat pe căile de reparare care abordează deteriorarea unei singure catene de ADN . Vom încheia această discuție despre

mecanismele de reparare a ADN-ului analizând ce se întâmplă atunci când ambele catene ale helixului ADN sunt rupte, de exemplu, ca urmare a expunerii la radiații ionizante. Aceste tipuri de deteriorare sunt extrem de periculoase pentru celule, putând duce la rearanjări cromozomiale, cancer sau moarte celulară. În această secțiune, vom discuta despre rupturile duble catenare în celulele eucariote.

căile de reparare a rupturilor duble catenare (DSB *)* , sunt activate și sunt responsabile de reunirea celor două catene de ADN rupte. Recent, interesul pentru repararea DSB a crescut deoarece defectele acestei căi au fost asociate cu hipersensibilitate la raze X și deficiențe imune. Aceste defecte pot fi, de asemenea, cauza predispoziției familiale la cancerul de sân și ovarian.

O altă cale implicată în repararea rupturilor duble catenare este repararea prin recombinări omoloage . Primul pas în acest proces implică activitatea unei enzime care recunoaște ruptura duble catenare și apoi digeră capetele 5' ale helixului de ADN rupt, lăsând capetele 3' proeminente (Figura 15.16). Unul dintre capetele proeminente caută o regiune de secvență complementară pe cromatida soră și apoi invadează duplexul de ADN omolog, aliniind secvențele complementare. Odată aliniată, sinteza ADN-ului are loc din capetele 3' proeminente, utilizând ca șabloane de ADN nedeteriorate. Interacțiunea celor două cromatide surori este necesară deoarece, atunci când ambele catene ale unei helixuri sunt rupte, nicio catenă de ADN parental nedeteriorată nu rămâne disponibilă pentru a fi utilizată ca secvență șablon complementară de ADN în timpul reparării. După sinteza necesară pentru repararea ADN-ului, molecula heteroduplex rezultată se rezolvă și cele două cromatide se separă, așa cum am discutat anterior în Capitolul 11.

De obicei, repararea DSB are loc în timpul fazei S târzii sau al fazei G2 timpurii a ciclului celular, după replicarea ADN-ului, când cromatidele surori sunt disponibile pentru a fi utilizate ca șabloane pentru reparare. Deoarece în timpul sintezei de reparare se utilizează o șabloană nedeteriorată, repararea prin recombinări omoloage este un proces extrem de precis.

O a doua cale, numită reparare prin reasamblare neomologă sau îmbinare la capete neomoloage, repară, de asemenea, rupturile dublu catenare . Cu toate acestea, așa cum sugerează și numele, acest mecanism nu recrutează o regiune omologă de ADN în timpul reparării. Acest sistem este activat în timpul fazei G1, înainte

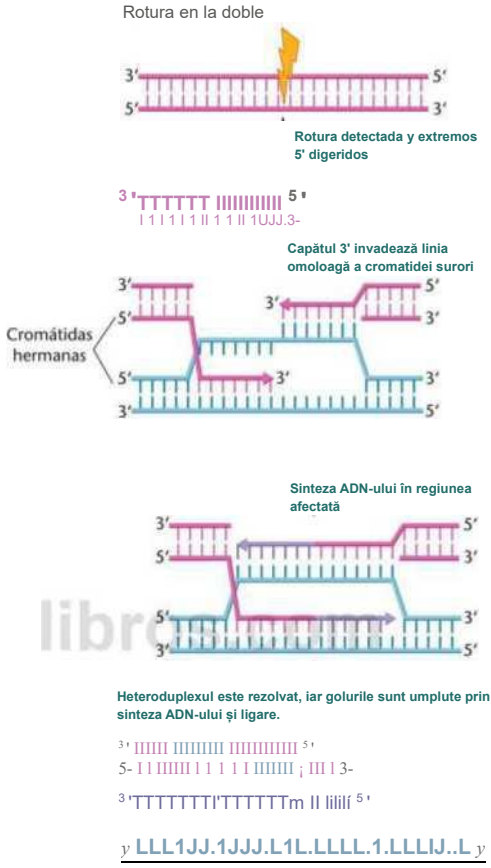

Rotura en la doble
3′
5′
5′
3′
Rotura detectada y extremos 5' digeridos
3 'TTTTTT IIIIIIIIIII 5 '
I 1 I 1 1 1 II 1 1 II 1UJJ.3-
Capătul 3' invadează linia omoloagă a cromatidei surori
Cromátidas hermanas
Sinteza ADN-ului în regiunea afectată
Heteroduplexul este rezolvat, iar golurile sunt umplute prin sinteza ADN-ului și ligare.
3 ' IIIIII IIIIIIIII IIIIIIIIIII 5 '
5- I I IIIIII I 1 1 1 I IIIIIII ¡ III I 3-
3 'TTTTTTTI'TTTTTTm II lililí 5 '
y LLL1JJ.1JJJ.L1L.LLLL.1.LLLIJ..L y

FIGURA 15.16 Etapele reparării prin recombinări omoloage a rupturilor lanțului dublu.

Replicarea ADN-ului implică un complex de numeroase proteine, inclusiv o protein kinază dependentă de ADN și produsul genei de susceptibilitate la cancerul pulmonar , BRCA1. Acestea și alte proteine se leagă de capetele libere ale ADN-ului rupt , taie capetele și le reunesc . Deoarece unele secvențe de nucleotide se pierd în acest proces de reunificare , acest sistem de reparare este predispus la - erori. În plus, dacă mai mult de un cromozom suferă o ruptură dublă catenară , capetele incorecte se pot uni, rezultând structuri cromozomiale anormale , cum ar fi cele discutate în Capitolul 8.

AHORA RESUELVA ESTO

15.4 Los genetistas utilizan a menudo metanosulfonato de etilo (EMS) para inducir mutaciones en *Drosophila*. ¿Por qué EMS es uno de los mutágenos preferidos para las investigaciones genéticas? ¿Cuáles serían los efectos de EMS sobre una cepa de *Drosophila* que careciera de sistemas funcionales de reparación de emparejamientos erróneos?

■ **SUGERENCIA:** *este problema nos pide evaluar la utilidad de EMS como mutágenoy determinar sus efectos en ausencia de mecanismos de reparación del ADN. La clave para resolverlo es considerar los efectos químicos que tiene el EMS sobre el ADN. Asimismo, considere los tipos de reparación del ADN que pueden operar sobre ADN que haya sufrido mutación por EMSy la eficiencia de esos procesos.*

15.6

Testul Ames este utilizat pentru a evalua mutagenitatea compușilor chimici

Există o mare îngrijorare cu privire la potențialele proprietăți mutagene ale oricărei substanțe chimice care pătrunde în corpul uman, fie prin piele, prin sistemul digestiv sau prin sistemul respirator . Exemple de componente chimice care ne pot afecta includ cele găsite în poluarea aerului și a apei, conservanții și aditivii alimentari, îndulcitorii artificiali, erbicidele, pesticidele și produsele farmaceutice. După cum am văzut, mutagenitatea poate fi testată în diverse organisme, cum ar fi ciupercile, plantele și celulele mamiferelor cultivate; cu toate acestea, unul dintre cele mai comune teste, pe care îl descriem aici, utilizează bacterii.

Testul Ames utilizează o serie de tulpini de Salmonella typhimurium selectate *pentru capacitatea* lor de a dezvălui tipuri specifice de mutații. De exemplu, unele tulpini sunt utilizate pentru a detecta substituții de perechi de baze , iar altele pentru a detecta diverse mutații de schimbare de fază. Fiecare tulpină conține o mutație într-una dintre genele operonului histidină. Tulpinile mutante nu sunt capabile să sintetizeze histidină (tulpini *his~*) și, prin urmare, necesită histidină pentru a crește (Figura 15.17). Testul măsoară frecvența mutațiilor inverse care apar în cadrul genei mutante și au ca rezultat o bacterie de tip sălbatic (revertanți his). Aceste tulpini *de Salmonella* au o sensibilitate crescută la mutageni datorită prezenței mutațiilor în genele implicate în repararea deteriorării ADN-ului și în sinteza barierei lipopolizaharidice care acoperă bacteria și o protejează de substanțele externe.

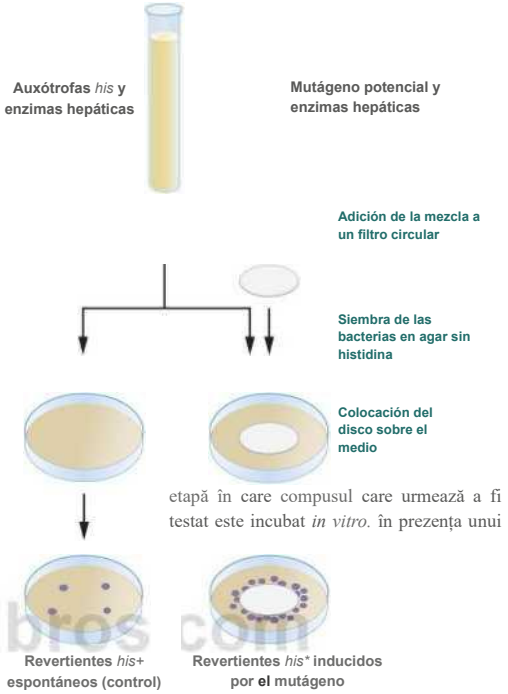

Auxótrofas *his* y enzimas hepáticas
Mutágeno potencial y enzimas hepáticas
Adición de la mezcla a un filtro circular
Siembra de las bacterias en agar sin histidina
Colocación del disco sobre el medio
Incubare la 37°C
Revertientes *his*+ espontáneos (control)
Revertientes *his*+ inducidos por el mutágeno

FIGURA 15.17 Testul Ames, care analizează potențialul mutagen al substanțelor chimice.

Multe substanțe care intră în corpul uman sunt relativ inofensive până când sunt activate metabolic , de obicei în ficat , în produse mai active din punct de vedere chimic . Astfel, testul Ames include o etapă în care compusul care urmează a fi testat este incubat *in vitro.* în prezența unui extract de ficat de mamifere. O altă alternativă este injectarea compușilor în șoareci astfel încât enzimele lor hepatice să îi modifice, iar apoi aceștia să fie recuperați pentru utilizare în testul Ames.

La utilizarea inițială a testului Ames în anii 1970, au fost examinați un număr mare de substanțe cancerigene cunoscute , sau agenți cancerigeni , și s-a constatat că peste 80% erau mutageni puternici . Acest lucru nu este surprinzător , deoarece transformarea celulelor într-o stare malignă are loc ca urmare a unor mutații. De exemplu, peste 60 de compuși prezenți în fumul de țigară au rezultate pozitive la testul Ames și cauzează cancer în studiile pe animale. Deși un rezultat pozitiv la testul Ames nu dovedește că un compus este cancerigen, testul Ames este util ca

instrument preliminar de screening. Testul Ames este utilizat pe scară largă în dezvoltarea industrială și farmaceutică a substanțelor chimice.

15,7

Geneticienii folosesc mutațiile pentru a identifica genele și a studia funcția genelor

Pentru a înțelege genele și procesele care reglează funcțiile biologice, geneticienii studiază adesea efectele mutațiilor asupra organismelor model. Un organism model ar trebui să fie ușor de reprodus și cultivat, să aibă o perioadă de generație scurtă , să producă urmași abundenți și să fie ușor de mutagenizat și încrucișat. Cele mai utilizate organisme model sunt bacteriile (E. *coli),* drojdia de bere *(Saccharomyces cerevisiae),* musca de fructe *(Drosophila melanogaster),* nematodele *(Caenorhabditis elegans),* peștele zebră *(Danio rerio),* planta de muștar *(Arabidopsis thaliana)* și șoarecele *(Mus musculus).*

În această secțiune vom descrie câteva dintre metodele pe care geneticienii le utilizează pentru a genera și detecta mutații în gene, ca prim pas către efectuarea unei analize genetice complete.

Inducerea mutațiilor cu radiații, compuși chimici și inserția de transpozoni

Geneticienii își încep uneori analizele examinând mutațiile care apar spontan, în mod natural . Cu toate acestea, deoarece mutațiile sunt adesea rare în natură, geneticienii trebuie să inducă mutații în organismele model pentru a crește șansele de a detecta un mutant relevant. Scopul mutagenezei este de a crea o mutație aleatorie în genomul fiecărui individ din populația experimentală, astfel încât la fiecare individ să fie afectat un produs genetic, lăsând restul genomului de tip sălbatic.

În timpul analizelor genetice, cercetătorii utilizează o gamă largă de mutageni diferiți, în funcție de tipul de mutație dorit. De exemplu, radiațiile ionizante pot fi utilizate pentru a induce rupturi , deleții și translocații cromozomiale . Deși utile pentru anumite tipuri de studii, astfel de mutații au adesea efecte severe asupra fenotipului, complicând analiza genetică ulterioară. În schimb, compușii chimici precum metansulfonatul de etil (EMS) și nitrozoguanidina provoacă modificări ale unei singure perechi de baze și deleții și inserții mici. Acești mutageni pot genera o gamă de fenotipuri mutante, de la ușoare la severe. Mutațiile condiționate, cum ar fi cele sensibile la temperatură , sunt deosebit de utile pentru studierea funcțiilor genetice esențiale. Aceste mutații sunt mai susceptibile să rezulte din modificări ale unei singure perechi de baze decât din deleții sau inserții mai lungi. Geneticienii folosesc, de asemenea, transpozoni pentru a crea mutații. Dacă un pozon trans, cum ar fi, de exemplu, un element *P* La *Drosophila, un transpozon* se inserează în regiunile codificatoare sau reglatoare ale unei gene și poate afecta funcția genei respective. Transpozonii și mutațiile acestora sunt explicate mai detaliat în secțiunea următoare.

Mai recent, tehnicile de genomică și genetică inversă au extins metodele disponibile pentru studierea mutațiilor, a funcției genelor și a bolilor umane. Odată ce o genă a fost identificată și clonată, analiza secvenței genelor mutante și normale obținute de la indivizi afectați și neafectați poate dezvălui baza moleculară a bolii sau fenotipul mutant. În plus, cunoașterea secvenței genei mutante poate deschide calea pentru dezvoltarea de teste genetice țintite și terapii bazate pe gene.

Urmărirea și selecția mutațiilor

Următorul pas în analiza genetică utilizând organisme model implică identificarea indivizilor din cadrul populației mutagenizate care posedă mutații sau gene care afectează fenotipul de interes. Cea mai comună metodă pentru detectarea mutanților este screening-ul genetic. Screening-ul genetic poate implica examinarea vizuală sau biochimică a unui număr mare de organisme mutagenizate. De exemplu, Mendel a pus bazele științifice pentru genetica transmiterii prin screening-ul a mii de plante individuale de mazăre pentru trăsături fenotipice vizibile. În mod similar, oamenii de știință au folosit teste biochimice moderne ale proteinelor endospermului de porumb pentru a detecta *tulpina mutantă opacă-2.* Această tulpină conține niveluri ridicate de lizină, care sporește valoarea nutritivă a plantei.

Este ușor de observat cum pot fi detectate mutațiile dominante în timpul screeningului genetic atât la organismele haploide, cât și la cele diploide. Atâta timp cât mutația dominantă nu este letală într-un stadiu incipient de dezvoltare, fenotipul va fi imediat vizibil la orice organism purtător al unei mutații dominante în gena relevantă. Mutantul poate fi apoi reprodus, putând fi menținute colecții de indivizi heterozigoți sau homozigoți.

Totuși, majoritatea mutațiilor duc la pierderea funcției genelor, iar majoritatea acestor mutații cu pierdere a funcției sunt recesive. Organisme

Organismele care au o fază haploidă în ciclul lor de viață, cum ar fi drojdia dură, oferă un avantaj semnificativ în detectarea mutanților recesivi, deoarece fenotipul mutant va fi imediat evident la individul haploid mutat. Mutația poate fi apoi încrucișată și analizată în fazele diploide ale ciclului de viață.

Organismele diploide heterozigote pentru o alelă recesivă nu vor prezenta fenotipul mutant. Pentru a depăși acest lucru, geneticienii au dezvoltat câteva strategii complexe pentru detectarea și recuperarea mutațiilor recesive la organismele diploide. Aceste metode necesită încrucișarea indivizilor mutagenizați cu tulpini speciale care au o serie de markeri genetici vizibili și letali sau cromozomi care conțin deleții specifice. După trei sau mai multe generații, mutația letală poate deveni evidentă, dar tulpina mutantă poate fi menținută într -o stare heterozigotă. Deși aceste tehnici sunt dificil de aplicat, ele sunt destul de eficiente. Multe dintre mutațiile de dezvoltare la Drosophila *discutate* în Capitolul 18 au fost identificate folosind aceste tehnici.

15,8

Elementele transpozabile se mișcă în genom și pot crea mutații.

Elementele genetice transpozabile , numite și transpozoni sau „gene săritoare", se pot deplasa sau transpune în interiorul și între cromozomi, inserându-se în diverse locații din genom.

Transpozonii se găsesc în genomurile tuturor organismelor , de la bacterii la oameni. Aceștia nu sunt doar omniprezenți, ci cuprind și porțiuni mari din unele genomuri eucariote. De exemplu, aproape 50% din genomul uman este derivat din elemente transpozabile . Unele organisme cu genomuri anormal de mari, cum ar fi salamandrele și orzul , conțin sute de mii de copii ale diferitelor tipuri de elemente transpozabile. Deși funcția acestor elemente este necunoscută , datele din secvențierea genomului uman sugerează că unele gene ar fi putut evolua din transpozoni și că activitatea transpozonilor ajută la modificarea și restructurarea genomului. Elementele transpozabile s-au dovedit, de asemenea, a fi instrumente valoroase în cercetarea genetică. Geneticienii au folosit transpozonii ca mutageni, ca etichete de clonare și ca vehicule pentru introducerea ADN-ului străin în organismele model.

În această secțiune, vom examina elementele transpozabile ca mutageni naturali . Deplasarea transpozonilor de la un loc la altul în cadrul genomului are capacitatea de a perturba genele și de a provoca mutații, precum și de a genera leziuni cromozomiale, cum ar fi rupturile dublu catenare.

Secvențe de inserție și transpozoni bacterieni

Bacteriile posedă două tipuri de elemente transpozabile : secvențe de inserție și transpozoni bacterieni . Secvențele de inserție (elementele IS) se pot deplasa de la un loc la altul și, dacă sunt inserate într-o genă sau o regiune reglatoare, pot provoca mutații.

Elementele IS au fost identificate pentru prima dată în timpul analizei mutațiilor din operonul *gal* de *E. coli.* Cercetătorii au descoperit că anumite mutații din acest operon se datorau prezenței a câteva sute de perechi de baze ADN suplimentare inserate la începutul operonului. În mod surprinzător, segmentul de ADN mutagen s-a putut exciza spontan din acea locație, restabilind funcția de tip sălbatic a operonului *gal* . Investigațiile ulterioare au relevat faptul că mai multe alte elemente de ADN se pot comporta într- un mod similar , inserându-se în cromozomii bacterieni și afectând funcția genelor .

Elementele IS sunt relativ scurte, nu depășind 2000 de perechi de baze (2 kb). Prima secvență de inserție caracterizată în E. *coli ,* IS1, are aproximativ 800 de perechi de baze. Alte elemente IS, cum ar fi IS2, 3, 4 și 5, au între 1.250 și 1.400 de perechi de baze. Elementele IS sunt prezente în copii multiple în genomul bacterian . De exemplu, cromozomul *E. coli* Conține cinci până la opt copii de IS1, cinci copii de IS2 și IS3, precum și copii ale altor elemente IS de pe plasmide, cum ar fi factorii E.

Toate elementele IS au două caracteristici esențiale pentru mobilitatea lor . În primul rând , conțin o genă care codifică o enzimă numită transpozază. Această enzimă este responsabilă de tăierea ADN -ului cromozomial , în care se poate insera elementul IS . În al doilea rând, capetele elementelor 1S conțin repetiții terminale inversate (ITR). ITR-urile sunt segmente scurte de ADN care au aceeași secvență de nucleotide , dar sunt orientate în direcții opuse (Figura 15.18). Deși Figura 15.18 prezintă ITR-uri constând doar din câteva nucleotide, ITR-urile elementelor IS conțin de obicei aproximativ 20 până la 40 de perechi de nucleotide. ITR-urile sunt esențiale pentru transpoziție și funcționează ca situsuri de recunoaștere pentru legarea enzimei transpozază .

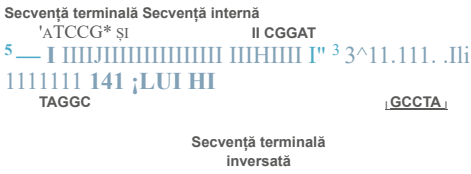


FIGURA 15.18 Secvență de inserție (IS), în violet. Secvențele terminale sunt repetiții inversate exacte.

Transpozonii bacterieni (elementele Tn) sunt mai mari decât elementele IS și conțin gene care codifică proteine a căror funcție nu este legată de transpoziție. Unele elemente Tn, cum ar fi Tnl0, constau dintr-o genă de rezistență la medicamente flancată de două elemente IS cu orientări opuse. Elementele IS codifică enzima transpozază, care este necesară pentru transpoziția elementului Tn. Alte tipuri de elemente Tn, cum ar fi Tn3, au secvențe scurte, inversate și repetate la capete și codifică enzima lor transpozază prin intermediul unei gene transpozază situate în mijlocul elementului Tn. La fel ca elementele IS, elementele Tn sunt mobile atât pe cromozomii bacterieni, cât și pe plasmide și pot provoca mutații dacă se inserează în gene sau în regiunile lor de reglare.

În prezent, elementele Tn prezintă un mare interes deoarece pot introduce rezistențe multiple la medicamente în plasmidele bacteriene. Aceste plasmide, numite factori R, pot conține numeroase elemente Tn care conferă simultan rezistență la metale grele, antibiotice și alte medicamente. Aceste elemente se pot deplasa de la plasmide la cromozomii bacterieni și pot răspândi rezistențe multiple la medicamente între diferite tulpini bacteriene.

Sistemul *Ac-Ds* la porumb

Cu aproximativ 20 de ani înainte de descoperirea transpozonilor în bacterii, Barbara McClintock a descoperit prezența elementelor genetice mobile în plantele de porumb. Ea a ajuns la această descoperire analizând comportamentul genetic a două mutații, *disociatoare (Ds)* și *activatorul (Ac),* care sunt exprimați în straturile de endosperm și aleuronă. Apoi, el a corelat aceste observații cu - examinarea citologică a cromozomilor de porumb. Inițial, McClintock a stabilit că locusul *Ds* se afla pe cromozomul 9. Dacă locusul *Ac* era prezent și în genom, Ds introducea o ruptură într-un punct al cromozomului adiacent acestuia. Dacă ruptura apărea în timpul dezvoltării celulelor somatice, celulele fiice pierdeau adesea o parte din cromozomul rupt , provocând diverse efecte fenotipice .

O analiză ulterioară i-a sugerat lui McClintock că, uneori , elementele *Ds* și *Ac* s-a mutat în alte locații cromozomiale. În timp ce Ds s-a mutat doar dacă *Ac* De asemenea , prezent, *Ac* se putea mișca autonom. Locul în care se afla Ds determina efectul genetic pe care îl producea ; adică , putea provoca ruperea cromozomilor sau inhiba expresia unei gene specifice . În celulele în care Ds provoca o mutație genetică , Ds se putea mișca din nou, revenind mutația la tipul sălbatic .

Figura 15.19 prezintă tipurile de mișcări și efectele cauzate de elementele Ds și Ac . *În* observațiile inițiale ale lui McClintock , când elementul Ds a sărit de pe cromozomul 9 , sinteza pigmenților a fost restabilită. McClintock a concluzionat că genele Ds și *Ac* erau elemente de control mobil. Astăzi, le numim în mod obișnuit elemente transpozabile , un termen inventat de un alt mare genetician al porumbului, Alexander Brink.

În prezent, mai multe elemente *de Ac* Elementele Ds au fost analizate , iar relația dintre ele a fost clarificată . Primul element Ds studiat (Ds9) este aproape identic cu *Ac,* cu excepția unei deleții de 194 de perechi de baze în gena transpozazei . Ștergerea unei părți a acestei gene în elementul Ds9 explică dependența sa de elementul *Ac* . pentru transpoziția sa . Au fost secvențiate și alte elemente Ds, prezentând două deleții și mai mari în gena transpozazei . Cu toate acestea , ITR-urile sunt menținute în toate .

importanța elementelor de control mobil propuse de Barbara McClintock nu a fost pe deplin apreciată după observațiile sale inițiale , analizele moleculare i-au confirmat concluziile. În 1983, Barbara McClintock a primit Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină.

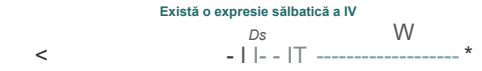
Elementele copie și P din *Drosophila*

Există peste 30 de familii de elemente transpozabile în *Drosophila,* Fiecare dintre aceste familii are până la 25-50 de copii pe genom. Împreună, aceste familii constituie aproximativ 5 % din genomul Drosophila și mai mult de jumătate din ADN -ul moderat repetitiv din acest organism. Un studiu sugerează că 50 % din toate mutațiile vizibile la *Drosophila* rezultă din inserarea transpozonilor în gene *de tip sălbatic* .

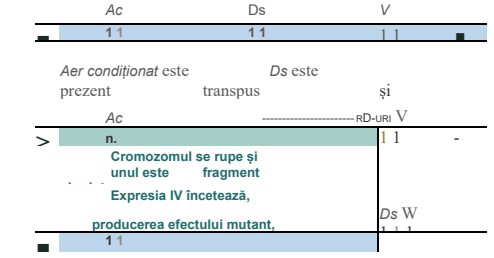
În 1975, David Hogness și colaboratorii săi, David Finnigan , Gerald Rubin și Michael Young, au identificat un tip de element ADN în *Drosophila melanogaster* pe care l-au numit copie. Aceste elemente transcriu cantități „copioase" de ARN (

de unde și numele).

(a) În absența lui *Ac, Ds* nu este transpus



(b) Când este prezent *Ac* , *Ds* poate fi transpus



(c) *Genele D* pot fi transpuse într-o altă genă și pot ieși din nou

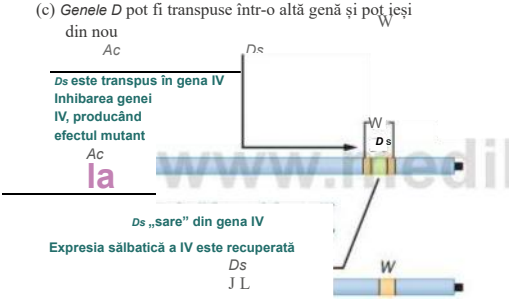


FIGURA 15.19 Efectele elementelor *Ac și Ds* asupra expresiei genelor. (a) Dacă *Ds* este prezent în absența *Ac,* gena ipotetică W, situată la distanță, este exprimată normal,
(b) În prezența *Ac, Ds* se transpune într-o regiune adiacentă genei *W. Ds* poate induce ruperea cromozomilor, ceea ce poate duce la pierderea unui fragment de cromozom care conține gena W. (c) În prezența *Ac, Ds* se poate transpune în gena W, alterându -i expresia. Dacă *Ds* se transpune ulterior în afara genei W, expresia acestei gene poate reveni la normal.

genomul celulelor Drosophila . Studiile de cartografiere arată că s-au transpus în diferite locații cromozomiale și sunt dispersate în tot genomul.

Fiecare element *de copie* are aproximativ 5.000 până la 8.000 de perechi de baze de ADN, inclusiv o secvență lungă de repetiții terminale directe (DTR) de 276 de perechi de baze la fiecare capăt. În cadrul fiecărui DTR se află o secvență de repetiții terminale inversate (ITR) de 17 perechi de baze (Figura 15.20). Aceste secvențe ITR scurte sunt

Copie genetică (5.000 de perechi de baze)

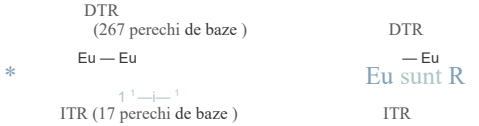


FIGURA 15.20 Organizarea structurală a unui element *de copie transpozabil* la *Drosophila melanogaster,* arătând repetițiile terminale.

Caracteristicile elementelor de copie . Secvențele DTR se găsesc și în transpozonii altor organisme , dar nu sunt universale.

Inserția unui element de *copie* depinde de prezența secvențelor ITR și pare să aibă loc preferențial la anumite ținte *din* genom . Elementele de copie prezintă efecte de reglare asupra locului de inserție de pe cromozom . S-a constatat că anumite mutații , cum ar fi unele care afectează culoarea ochilor și formarea segmentelor , rezultă din inserțiile de elemente de *copie* . în cadrul genelor . De exemplu, culoarea mutantă a ochilor *alb-caisă* este cauzată de o alelă a genei *albe* . conținând un element *de copie* inserat în genă. Transpoziția elementului *de copie* în afara alelei caisei *albe* . poate restabili caracterul de tip sălbatic al alelei.

Cele mai importante elemente transpozabile ale *Drosophilei* - sunt, ***probabil*** , elementele *P.* Aceste elemente au fost descoperite în timpul studierii fenomenului de disgeneză hibridă , o afecțiune care provoacă sterilitate, rate ridicate de mutație și rearanjări cromozomiale la urmașii încrucișărilor dintre anumite tulpini de musculițe de fructe. Disgeneza hibridă este cauzată de o rată mare de transpoziție a elementului *P.* în linia germinală, unde transpozonii *se* inserează în sau în apropierea genelor , provocând mutații. Elementele P *au* o lungime de 0,5 până la 2,9 kb , cu secvențe ITR de 31 de perechi de baze . Elementele P complete codifică cel puțin două proteine, dintre care una este enzima transpozază necesară pentru transpoziție , iar *cealaltă* este un represor care inhibă acest proces. Gena transpozazei este exprimată doar în linia germinală, ceea ce explică specificitatea tisulară a transpoziției elementului P. Tulpinile de musculițe care conțin elemente *P* Complet inserate în genomul lor sunt rezistente *la* transpoziții ulterioare datorită prezenței proteinei represoare codificate de elementele P.

Mutațiile pot apărea din diferite tipuri de inserții . Dacă un element *P* este inserat în regiunea codificatoare a unei gene, acesta poate termina transcripția genei și poate perturba expresia genelor normală . Dacă este inserat în regiunea promotorului unei gene, acesta poate afecta nivelul de

expresie al genei respective. Inserțiile în introni pot afecta splicing-ul sau pot provoca terminarea prematură a transcripției.

Geneticienii au exploatat elementele *P* ca instrumente pentru analiza genetică. Una dintre cele mai utile aplicații ale elementelor *P* este ca vectori pentru introducerea transgenelor în *Drosophila* - o tehnică numită transformare germinală. Elementele *P* sunt utilizate și pentru a genera mutații și a clona gene mutante . În plus, cercetătorii rafinează metodele de direcționare a inserțiilor de elemente *P* către situsuri cromozomiale unice și precise, ceea ce ar trebui să crească precizia transformării germinale pentru analiza activității genelor .

Elemente transpozabile în specia umană

Genomul uman, la fel ca cel al altor eucariote, este plin de ADN derivat din transpozoni. Date recente privind secvențierea genomului arată că aproximativ jumătate din genomul uman este alcătuit din elemente de ADN transpozabile. După cum am văzut în Capitolul 12, principalele familii de transpozoni umani sunt elementele dispersate lungi și elementele dispersate scurte (LINE și SINE, respectiv). Împreună, acestea reprezintă peste 30% din genomul uman. Alte familii de elemente transpozabile reprezintă încă 11% din genomul uman (Tabelul 15.5). Deoarece secvențele codificatoare cuprind doar 1% din genomul uman, există de 40 până la 50 de ori mai multe elemente de ADN transpozabile în genomul uman decât gene funcționale.

Deși majoritatea transpozonilor umani par a fi inactivi, mobilitatea lor potențială și efectele mutagene au implicații majore pentru genetica umană, așa cum se observă într-un exemplu recent al unui transpozon prins în flagrant. Acesta este cazul unui copil cu hemofilie. Una dintre cauzele hemofiliei este un defect al factorului VIII de coagulare a sângelui, produsul unei gene legate de - cromozomul X. Haig Kazazian și colegii săi au descoperit elemente LINE inserate în două puncte ale genei.

Elemente transpozabile ale genomului uman

Tipul elementului	Lungime	Copii în % din genom	
UNE	1-6 kb	850.000	21 de
SINUS	100-500 bp	1.500.000	13
Elemente LTR	<5 kb	443.000	8
Elemente ADN	80-300 bp	294.000	3
Neclasificat	—	3.000	0,1

cromozomii X ai mamei conținea și această LINE specifică. Dacă da, mama neafectată ar fi heterozigotă și ar fi transmis cromozomul care conținea LINE fiului ei. Descoperirea surprinzătoare a fost că secvența LINE *nu a fost* găsită pe niciunul dintre cromozomii X, ci a fost detectată pe cromozomul 22 al ambilor părinți. Acest lucru sugerează că acest element mobil s-ar fi putut transloca de la un cromozom la altul în celulele formatoare de gameți ale mamei înainte de a fi transmis fiului ei .

Există două cazuri separate de indivizi cu distrofie musculară Duchenne , rezultate din inserarea unui element LINE în gena distrofinei . Într-un caz, un transpozon a fost inserat în exonul 48, iar în celălalt, în exonul 44, ceea ce a dus în ambele cazuri la mutații de schimbare de fază și la terminarea prematură a translației proteinei distrofinei . Există, de asemenea, rapoarte despre inserții LINE în genele *APC și c-myc* , ducând la mutații care ar fi putut contribui la dezvoltarea unor tipuri de cancer de colon și plămâni . În aceste din urmă cazuri, transpoziția a avut loc doar într -una sau câteva celule somatice . În 2009 , cercetătorii au stabilit că anumite cazuri a cel puțin 11 boli umane se datorează inserției elementelor LINE .

Inserțiile de elemente SINE sunt, de asemenea, responsabile - pentru 30 de cazuri de boli umane. Într-unul dintre aceste cazuri, un element *Alu* S-a integrat în *gena BRCA2,* inactivând această genă supresoare tumorală , ceea ce a dus la un caz de cancer pulmonar. Alte gene care au *suferit mutații* din cauza integrării unui element *Alu includ* gena factorului IX . (care duce la hemofilie B), gena *ChE* (ceea ce duce la acolinesterasemie) și gena *NF1* (ceea ce duce la neurofibromatoză).

Transpozoni, mutații și evoluție

Transpozonii pot avea o gamă largă de efecte asupra genelor. Inserția unui transpozon în regiunea codificatoare a unei gene poate afecta cadrul normal de citire al genei pentru traducere sau poate induce terminarea prematură a traducerii ARNm-ului transcris din genă . Mulți transpozoni conțin proprii promotori și amplificatori, precum și situsuri de splicing și semnale de poliadenilare . Prezența acestor secvențe reglatoare ale transpozonilor poate afecta genele din apropiere . Inserția unui transpozon care conține semnale de poliadenilare sau de terminare a transcripției în intronul unei gene poate provoca terminarea transcripțională a genei în cadrul transpozonului. În plus, poate provoca splicing.

Transpozonii aberanți sunt o mutație în ARNm-ul transcris din genă. Inserția unui transpozon în regiunea de reglare transcripțională a unei gene poate afecta reglarea normală a genei sau poate determina exprimarea diferită a genei , ca urmare a prezenței promotorului sau secvențelor de amplificare proprii transpozonului . Prezența a doi sau mai mulți transpozoni identici într- un genom creează potențialul de recombinare între transpozoni, ducând la duplicații, deleții, inversiuni sau translocații cromozomiale. Oricare dintre aceste rearanjări poate duce la modificări sau tulburări fenotipice.

Se estimează că la una din 50 până la 100 de nașteri umane , au loc transpoziții în noua linie germinală. Majoritatea acestora nu produc tulburări sau modificări ale fenotipului ; cu toate acestea, se crede că aproximativ 0,2 % din mutațiile detectabile la oameni se pot datora inserțiilor de transpozoni . Alte gene par a fi mai afectate de transpoziție. Aproximativ 10 % din mutațiile noi la șoareci și 50% din mutațiile la *Drosophila* sunt cauzate de inserțiile de transpozoni în sau în apropierea genelor .

Datorită capacității lor de a altera genele și cromozomii, transpozonii pot contribui la variabilitatea necesară evoluției . De exemplu, elementele Tn din bacterii poartă gene de rezistență la antibiotice . între organisme, oferind o probabilitate mai mare de supraviețuire bacteriilor în anumite - condiții. Un alt exemplu de contribuție a unui transpozon la evoluție este cea oferită de telomerii *Drosophila* . La capetele cromozomului *Drosophila* se află elemente de tip LINE, iar aceste elemente acționează ca telomeri, menținând lungimea cromozomilor *Drosophila* în timpul diviziunilor celulare succesive. Alte exemple de transpozoni evoluați sunt genele *RAG1* și *RAG2* la oameni. Aceste gene codifică enzime recombinază care sunt esențiale pentru dezvoltarea sistemului imunitar. Se pare că aceste două gene au evoluat din transpozoni.

Transpozonii pot afecta, de asemenea, evoluția genomurilor prin modificarea modelelor de expresie genică în anumite moduri pe care gazda le păstrează ulterior. De exemplu, gena *amilazei umane* conține un amplificator care determină exprimarea genei în glanda parotidă. Acest amplificator a evoluat din secvențe de transpozoni care au fost inserate în regiunea de reglare a genei la începutul evoluției primatelor. Alte exemple de modele de expresie genică afectate de prezența secvențelor de transpozoni includ expresia genei *CD8* specifice celulelor T și expresia genei *leptinei* și *CYP19* specifice placentei .

Alinierea secvențelor pentru identificare o mutație

Domeniu de studiu: Explorare genomică

ȘI În acest capitol, am examinat cauzele diferitelor tipuri de mutații *și* am văzut cum mutațiile afectează fenotipul prin modificarea structurii și funcției proteinelor. Apariția genomicii, bioinformaticii și proteomicii ca discipline fundamentale ale geneticii moderne a oferit geneticienilor un nou set de instrumente pentru identificarea și analizarea mutațiilor în secvențele genelor și proteinelor.

În acest exercițiu, vom folosi site -ul web ExPASy (Expert Protein Analysis System), găzduit de Institutul Elvețian de Bioinformatică, care oferă o multitudine de resurse pentru analiza proteinelor . Vom folosi un program ExPASy numit SIM (prescurtare de la similaritatea secvenței) pentru a compara două secvențe de polipeptide pentru a detecta o mutație. Odată ce mutația este identificată, vom obține informații suplimentare despre gena codificată de aceste polipeptide și despre o tulburare umană asociată cu această genă.

■ Exercițiul I. Identificarea unei mutații missense care afectează o proteină la specia umană

1. **Vom începe acest exercițiu accesând site-ul web ExPASy la adresa http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html . Funcția SIM este un program software bazat pe algoritmi care ne permite să comparăm diverse secvențe polipeptidice , căutând asemănări între aminoacizii din secvențe.**

2. **Mai jos sunt prezentate două secvențe de aminoacizi pentru polipeptide exprimate la două persoane diferite.**

Persoana A

Un exemplu de performanță specifică este: a) introducerea unui ghid de programare și b) introducerea unui ghid de programare în codul poștal anterior . Un exemplu de corecție a textului original este o notă de siguranță în cazul în care introduceți o notă de siguranță în acest sens .

Persona B

Pentru a completa codul poștal, trebuie să consultați secțiunea „Înregistrare și evaluare”.

DAPSSGDDEDGEDEAEDTGV DTGAPYWTRPERMDKKLLAVPA ANTVRFRCPAAGNPTPSISWLKN GREFRGEHRIGGIKLRHQQWSL VM ESVVPSDRGNYTCVVENKFG SIRQTYTLDVLERSPHRPILQAGL PANQTAVLGSDVEFHCKVYSDA QVHDGVHIQ TPYVTVLKTAGANTTDKELEVLSL HNVTFEDAGEYTCLAGNSIGFS HHSAWLVVLPAEEELVEADEAGS VYAGILSYRVGFFLFILVVAAVTLCR LRSPPKKGLGSPTVHKISRFPLKR QVSLESNASMSMSSNTPLVRIARLSS GEGPTLANVSELELPADPKWELPADPKW EL SRARLTLIGQVVAAVTLCR VKMLKDDATDKDLSDLVSE MEMMKMIGKHKNIINLLGAC TQGGPLYVLVEYAAKGNLREFL Un astfel de circuit nu este compatibil cu un circuit închis. Pentru a specifica condițiile de utilizare, consultați secțiunea „Prezentarea sistemului” și „Până la data inscripționată pe ecran ” .

3. **Copiați și lipiți fiecare secvență în casetele de text *SECVENȚĂ* din SIM. (Sfat: Accesați aceste secvențe prin intermediul site-ului web însoțitor, astfel încât să puteți copia și lipi fiecare secvență în SIM.) Folosiți secvența Persoanei A pentru Secvența 1 și secvența Persoanei B pentru Secvența 2. Faceți clic pe butonul *Secvență introdusă de utilizator* pentru fiecare . Denumiți secvențele Persoana A și Persoana B. Trimiteți secvențele pentru comparare și apoi răspundeți la următoarele întrebări :**

a) Câți aminoacizi există în fiecare secvență polipeptidică analizată ?

b) Examinați cu atenție rezultatele alinierii. Puteți găsi vreo diferență între secvențele de aminoacizi atunci când comparați aceste două polipeptide? Ce ați descoperit?

■ Exercițiul II. Identificarea bazei genetice a unei tulburări genetice la specia umană

1. **Accesați pagina principală ExPASy și localizați linkul BLAST. Rulați o căutare de proteine BLAST (blastp) pentru a identifica polipeptida pe care am studiat-o. Explorați rapoartele BLAST pentru primele trei secvențe de proteine care s-au aliniat cu secvența noastră de interogare, făcând clic pe linkul pentru fiecare secvență. Acordați o atenție deosebită secțiunii de comentarii *a* fiecărui raport pentru a răspunde mai bine la întrebările de mai jos.**

2. **Acum, că știm cu ce genă lucrăm, accesați PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/queryfcgi?db=PubMed) și căutați un articol de sinteză pregătit de autorii Vajo, Z., Francomano, CA și Wilkin, D. J.**

3. **Răspundeți la următoarele întrebări :**

a) Ce genă codifică polipeptidele pe care le-ai studiat?

b) Care este funcția acestei proteine?

c) Pe baza a ceea ce ați învățat din rezultatele alinierii analizate în Exercițiul I, din rapoartele BLAST și din căutarea PubMed, ce boală umană este cauzată de mutația identificată în Exercițiul I? Explicați răspunsul și descrieți pe scurt fenotipurile asociate cu boala.

ŞI STUDIU DE CAZ | Nanism genetic

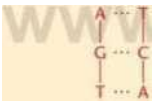
În șapte luni de sarcină , o viitoare mamă merge la o ecografie de rutină . Deși testele anterioare fuseseră normale, aceasta a arătat că membrele fătului erau anormal de scurte. Medicul a suspectat că fătul ar putea avea o formă genetică de nanism numită acondroplazie. I-a spus mamei că tulburarea era cauzată de o mutație autosomal dominantă și apărea la aproximativ una din 25.000 de nașteri . Viitoarea mamă studiase genetica la facultate și și-a ridicat imediat câteva întrebări. Cum avea să le răspundă?

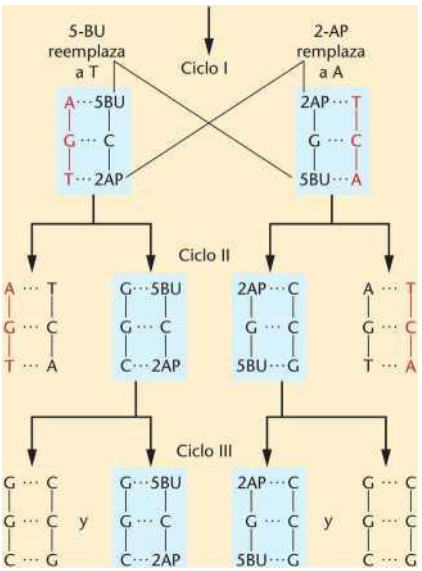
1. Cum ar putea fiul lor să aibă o tulburare moștenită dominant dacă nu ar exista antecedente ale acestei boli de nicio parte a familiei?
2. Este mai probabil ca mutația să provină de la mamă sau de la tată?
3. Dacă acest copil are acondroplazie, sunt șansele ca și următorul copil să o aibă?
4. Ar putea această tulburare să fi fost cauzată de radiografiile sau ecografiile pe care le-a făcut mai devreme în timpul sarcinii?

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Analogul de bază 2-aminopurina (2-AP) substituie adenina în timpul replicării ADN-ului , dar se poate împerechea cu citozina . Analogul de bază 5-bromouracil (5-BU) substituie timina , dar se poate împerechea cu guanina. Urmați secvența trinucleotidică dublu catenară prezentată mai jos timp de trei cicluri de replicare, presupunând că, în primul ciclu, ambii analogi sunt întâlniți și încorporați acolo unde este posibil . Înainte de al doilea și al treilea ciclu de replicare, orice analogi de bază neîncorporați sunt eliminați. Care vor fi secvențele finale?

Soluție





2. A fost studiată o mutație dominantă rară la om , care este exprimată la naștere . Înregistrările au arătat șase cazuri din 40.000 de nașteri. Pedigree-urile familiale au relevat că, în două dintre cazuri, mutația era deja prezentă la unul dintre părinți. Calculați rata de mutație spontană pentru această mutație. Ce presupuneri subiacente ar putea influența concluziile?

Soluție. Doar patru cazuri reprezintă o nouă mutație. Deoarece fiecare naștere reprezintă doi gameți, dimensiunea eșantionului este de 80.000 de evenimente meiotice . ^{Rata} este egală cu 4/80.000 = 1/20.000 = 5 x 10^{5}

Am presupus că gena mutantă prezintă penetranță completă și este exprimată la toți indivizii care o purtă . Dacă nu ar avea penetranță completă , calculul nostru ar fi o subestimare , deoarece am fi putut rata una sau mai multe mutații. De asemenea, am presupus că screening-ul a fost 100% precis. Unul sau mai mulți indivizi mutanți ar fi putut fi *„ratați”*, ceea ce a dus din nou la o subestimare . În cele din urmă, am presupus că viabilitatea indivizilor mutanți și nemutanți este egală și că toți supraviețuiesc în mod egal *in utero*. Prin urmare, presupunem că numărul de indivizi mutanți la naștere este egal cu numărul din momentul concepției. Dacă acest lucru nu ar fi adevărat, calculul nostru ar fi din nou o estimare conservatoare.

3. Luați în considerare următoarele estimări:
   (a) Există ^{5,5} x 10^{9} ființele umane care trăiesc pe planetă.
   (b) Fiecare individ are aproximativ $^{30.000}$ (0,3 x 10^{5}) gene.
   (c) Rata medie de mutație la fiecare locus este de $^{10^{5}}$.

Câte mutații spontane sunt prezente în prezent în populația umană? Presupunând că aceste mutații sunt distribuite în mod egal între toate genele, câte mutații noi au apărut în fiecare genă a populației umane?

Soluție. În primul rând , deoarece fiecare individ este diploid , există două copii ale fiecărei gene per persoană, fiecare provenind dintr-un gamet separat. Prin urmare , numărul total de mutații spontane este:

(2 X 0,3 X 10' gene / ^{individ})

X (10 ' ^{5} mutații/genă) = (0,6 x IO_{5}) X (5,5 x IO_{7}) X

Mutațiile X ($^{10^{5}) = 3,3 X 10^{4}}$ mutații în populație.

3,3 Mutații X 10" / 0,3 gene X 10' =

= 11 X 10^{4} ^{mutații} per genă în populație.

Puncte de rezumat

1. Mutațiile pot fi spontane sau induse, somatice sau germinale, autozomale sau legate de sex. Mutațiile pot avea multe efecte diferite asupra funcției genelor, în funcție de tipul de modificare nucleotidică implicată și de localizarea acelor mutații .
2. Mutațiile spontane pot apărea în multe moduri , de la erori în timpul replicării ADN-ului până la deteriorarea bazelor ADN-ului ca urmare a metabolismului celular normal.
3. Mutațiile pot fi induse și de multe tipuri de substanțe chimice și de radiații. Acești agenți pot deteriora atât bazele, cât și catena fosfat-zahăr a moleculelor de ADN .
4. Mutațiile unei singure gene la oameni pot provoca o gamă largă de tulburări. Aceste mutații pot fi

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

modificări ale perechilor de baze, inserții, deleții și repetiții extinse de ADN.
5. Organismele contracarează mutațiile prin sisteme de reparare a ADN-ului, inclusiv detectarea erorilor, repararea nepotrivirilor , repararea post-replicativă , repararea prin fotoreactivare , sistemul de reparare - SOS , repararea prin excizia bazelor, repararea prin excizia nucleotidelor și repararea rupturilor dublu catenare.
6. Testul Ames permite oamenilor de știință să evalueze potențialul mutagen și cancerigen al agenților chimici.
7. Geneticienii utilizează o gamă largă de tehnici genetice și biochimice pentru a induce și analiza mutații la organismele model.
8. Elementele transpozabile se pot mișca în cadrul genomului , creând mutații și alterând expresia genelor . În plus , transpozonii pot contribui la evoluție.

Probleme *și* întrebări pentru discuții

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor , vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

DE CUM ȘTIM «

În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care apar mutațiile genetice și asupra modului în care celulele repară daunele ADN-ului . În același timp, am avut numeroase ocazii să analizăm metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?

(a) De unde știm că mutațiile apar spontan ?
(b) De unde știm că anumite substanțe chimice și anumite lungimi de undă ale radiațiilor induc mutații în ADN ?
(c) mecanismele de reparare a ADN-ului detectează și corectează majoritatea mutațiilor spontane și induse ?

2. Explicați importanța mutațiilor în studiile genetice.
Ce este o mutație spontană și de ce este rar acest tip de mutație?
De ce ar putea o mutație într-o celulă somatică a unui organism multicelular să scape detectării ?
că majoritatea mutațiilor sunt dăunătoare. De ce este rezonabil să se afirme că mutațiile sunt esențiale pentru procesul evolutiv ?
De ce mutațiile aleatorii sunt mai predispuse la a fi letale decât benefice?
Majoritatea mutațiilor dintr-un organism diploid sunt recesive . De ce?
6. Ce se înțelege prin mutație condiționată?
Descrieți conceptul de modificare tautomerică și explicați cum poate duce aceasta la o mutație.
Enumerați asemănările și deosebirile dintre efectele mutagene ale
8. agenților de dezaminare, agenților alchilanți și analogilor bazici .
9. Coloranții acridinici induc mutații cu schimbare de fază. De ce mutațiile cu schimbare de fază au mai multe
10.

Care sunt șansele ca mutațiile punctuale , în care se substituie o singură
12. pirimidină sau purină, să fie dăunătoare ?
De ce sunt razele X mutageni mai puternici decât radiațiile UV?
Deteriorarea ADN-ului cauzată de diverși agenți naturali și artificiali - declanșează o gamă largă de răspunsuri celulare care implică numeroase căi distincte de semnalizare. Pe lângă activarea mecanismelor de reparare a ADN-ului, pot fi activate și căi care duc la apoptoză (moarte celulară programată) și oprirea ciclului celular . De ce sunt apoptoza și oprirea ciclului celular componente comune ale răspunsului celular la deteriorarea ADN-ului?
mecanisme de reparare a ADN-ului cunoscute pentru contracararea efectelor radiațiilor UV. Ce rol joacă lumina vizibilă în repararea mutațiilor induse de UV ?
Mamografia este o tehnică de înaltă precizie pentru detectarea cancerului de sân la om . Deoarece această tehnică utilizează razele X
15. în scopuri diagnostice, a provocat controverse considerabile . Puteți explica de ce? Ce motive justifică utilizarea razelor X pentru acest tip de tehnică de diagnostic ?
Un număr semnificativ de mutații în gena HBB care provoacă J-talasemie la om apar în introni sau în secvențe necodificatoare din amonte. Explicați de ce mutațiile din aceste regiuni cauzează adesea
16. tulburări severe, chiar dacă este posibil să nu modifice direct regiunile codificatoare ale genei.
Descrieți testul Ames pentru screening-ul potențialilor mutageni de mediu. De ce se crede că o substanță care dă un rezultat pozitiv la testul Ames poate fi și cancerigenă?
Ce defecte genetice cauzează xeroderma pigmentosum (XP) la om ?
17. Cum generează aceste defecte fenotipurile asociate cu această boală ?
Comparați diferitele elemente genetice transpozabile din bacterii, porumb *și Drosophila* și specia umană . Ce caracteristici au în comun?
18.

19.

20. Speculați asupra modului în care îmbunătățirile condițiilor de viață și ale îngrijirii medicale în țările dezvoltate pot afecta ratele de mutație la oameni, atât pentru mutațiile neutre, cât și pentru cele dăunătoare .
21. La porumb , un transpozon *Ds* sau *Ac* Poate provoca mutații în genele situate la sau în apropierea punctului de inserție al transpozonului . Aceste elemente sunt capabile să se transpună de la locul lor original, provocând o inversare a fenotipului mutant. Cu toate acestea, în unele cazuri, apar fenotipuri și mai severe din cauza evenimentelor care au loc în sau în apropierea alelei mutante . Ce s-ar putea întâmpla cu transpozonul sau cu gena din apropiere pentru a crea mutații și mai severe ?
22. Se estimează că aproximativ 0,2% din mutațiile la oameni se datorează inserțiilor de transpozoni , iar un grad mult mai mare de determinare mutațională este cunoscut și în alte organisme . În ce moduri ar putea transpozonii să contribuie pozitiv la evoluție ?
23. Un mutagen puternic este adăugat la o cultură bacteriană ale cărei celule nu pot sintetiza leucină *(leu')*, iar celulele sunt lăsate să finalizeze un ciclu de replicare . Apoi, se prelevează probe, se fac o serie de diluții, iar celulele sunt plasate pe mediu minimal sau mediu minimal cu adaos de leucină. Prima condiție de cultură (mediu minimal) permite doar creșterea *celulelor leu',* în timp ce a doua condiție de cultură (mediu minimal cu adaos de leucină) permite tuturor celulelor să crească. Rezultatele experimentului sunt prezentate mai jos.

Condiții de creștere	Diluare	Colonii
Medie minimă	10^{-1}	18 ani
Mediu minim + leucină	10^{-7}	6

Care este rata de mutație la locusul implicat în biosinteza leucinei?

Probleme picante r

24. Următoarele sunt descoperiri ipotetice obținute într-o investigație a heterocariotelor formate din șapte tulpini de celule umane afectate de xeroderma pigmentosum.

	XPt	*XP2*	*XP3*	*XP4*	*XPS*	*XP6*	*XP7*
XP1	—						
XP2	—	—					
XP3	—	—	—				
XP4	+	+	+	—			
XPS	+	+	+	+	—		
XP6	+	+	+	+	—	—	
XP7	+	-	+	4-	—	—	—

***Notă:* « + » = complementare; « —» = fără complementare.**

Aceste date reprezintă măsuri ale apariției sau absenței sintezei neprogramate a ADN-ului în heterocariotele fuzionate. Niciuna dintre tulpini nu prezintă sinteză neprogramată a ADN-ului pe cont propriu. Care tulpini aparțin aceluiași grup de complementare ? Câte grupuri există pe baza acestor date? Ce se poate concluziona despre baza genetică a XP din aceste date?

25. Imaginează-ți că ești unul dintre geneticienii din echipa care a întreprins investigarea efectelor genetice ale radiațiilor de înaltă energie asupra populației japoneze care a supraviețuit bombardamentelor atomice de la Hiroshima și Nagasaki din 1945, imediat după atacuri . Demonstrează- ți cunoștințele despre mutațiile cromozomiale și genetice prin schițarea unui proiect logic pe termen scurt și lung care abordează efectele acestor radiații. Asigură-te că incluzi strategii pentru a lua în considerare efectele atât asupra țesuturilor somatice, cât și asupra celor germinale.
26. Știind că radiațiile provoacă mutații, mulți oameni presupun că formele de radiații generate de om sunt principalul factor care contribuie la povara mutațiilor din specia noastră. Ce dovezi sugerează contrariul?
27. Echivalentele umane ale proteinelor de reparare a nepotrivirilor ADN-ului bacterian sunt supuse

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com

la deteriorarea mutațională , la fel ca restul proteinelor . Ce dovezi indică faptul că mutațiile genelor de reparare a nepotrivirilor ADN- ului uman sunt legate de anumite forme de cancer?

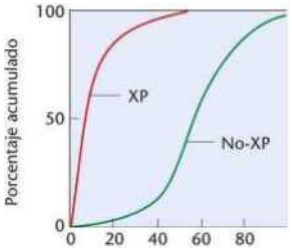
28. În universul *Star Trek* *, Capacitatea betazoizilor de a citi gândurile este controlată de o genă numită „cititor de gânduri" (prescurtat ! m). Majoritatea Beta Zoidilor pot citi gândurile, dar *există* mutații recesive rare în gena Im Acestea generează două fenotipuri alternative : *receptori întârziați* și *insensibili* . Receptorii întârziați au o oarecare capacitate de a citi gândurile, dar o fac mult mai lent decât betazoizii normali. Receptorii insensibili nu pot citi gândurile . Genele betazoide nu au introni , așa că genele lor conțin doar ADN codificator. Gena *Im* Este alcătuit din 3.332 de nucleotide, iar betazoidele folosesc un cod genetic de patru litere .
Tabelul următor prezintă câteva date despre cinci mutații *Im* fără legătură .

Mutație	Descrierea mutației	Fenotip
/m-1	Mutație fără sens la codonul 829	Receptor întârziat
/m-2	Mutație Missense la codonul 52	Receptor întârziat
/m-3	Ștergerea nucleotidelor 83-150	Receptor întârziat
/m-4	Mutație Missense la codonul 192	Insensibil
/m-5	Ștergerea nucleotidelor 83-93	Insensibil

Propuneți o explicație plauzibilă pentru motivul pentru care fiecare dintre aceste mutații are ca rezultat fenotipul asociat și nu altul. De exemplu, formulați ipoteza de ce mutația nonsens Im *-1* la codonul 829 produce un fenotip ușor al receptorului întârziat, mai degrabă decât un fenotip sever insensibil . Repetați această analiză pentru toate mutațiile . Există

mai multe explicații posibile, așa că fiți creativi, dar rămâneți în limitele plauzibilității.

29. Riscul de a dezvolta cancer de piele este aproape același cu cel al tuturor celorlalte tipuri de cancer la un loc. Graficul de mai jos (modificat după Kraemer. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94:11-14) arată vârsta de debut a cancerului de piele la pacienții cu și fără XP , procentul relativ de cancer de piele reprezentat grafic în funcție de vârstă . Curba pentru cei fără XP se bazează pe 29.757 de tipuri de cancer tratate de Institutul Național al Cancerului , iar curba pentru cei cu XP se bazează pe 63 de tipuri de cancer de piele din Registrul Xeroderma Pigmentosum.
    (a) Rezumați informațiile din grafic.
    (b) Explicați de ce persoanele afectate de XP prezintă o vârstă atât de fragedă de debut.



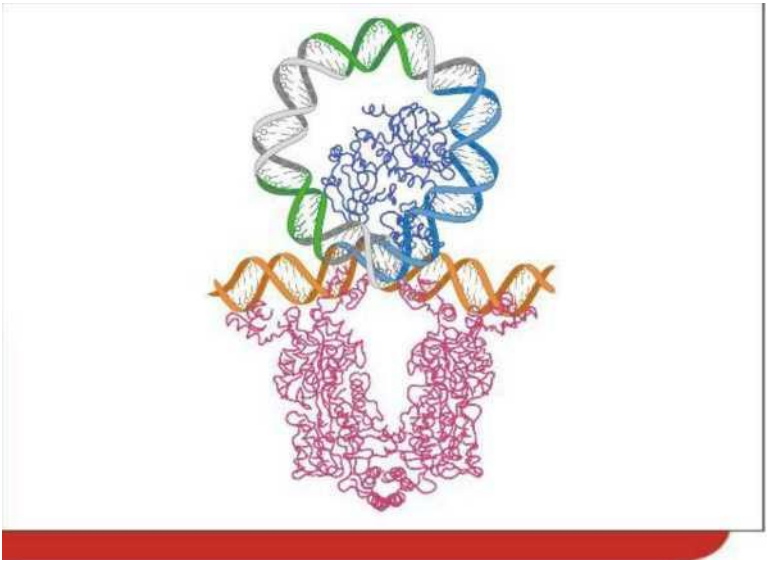
30 Descoperirea inițială a elementelor IS în bacterii a relevat prezența unui element în amonte (5') a trei gene care controlează metabolismul galactozei. Toate cele trei gene au fost afectate simultan, chiar dacă a existat o singură inserție IS. Oferiți o explicație pentru motivul pentru care s-ar putea întâmpla acest lucru.

31. S-a observat că majoritatea transpozonilor la oameni și la alte organisme sunt localizați în regiuni necodificatoare ale genomului - regiuni precum introni, pseudogene și fragmente de tipuri repetitive de ADN. Există mai multe modalități de a interpreta această observație. Descrieți două interpretări posibile. Care credeți că este mai corectă? De ce?

32. Mutațiile genei IL2RG cauzează aproximativ 30% din cazurile de imunodeficiență combinată severă (SCID) . Aceste mutații duc la modificări ale unei componente proteice a receptorilor de citokine , esențială pentru dezvoltarea corectă a sistemului imunitar . Gena *IL2RG* Este compusă din opt exoni și conține secvențe în amonte și în aval necesare pentru o transcripție și o traducere corecte . Unele dintre mutațiile observate sunt enumerate mai jos . Pentru fiecare mutație, explicați probabila sa influență asupra produsului genei *I1.2RG* . (presupunând că lungimea sa este de 375 de aminoacizi).
    (a) Mutație nonsens în regiunile codificatoare .
    (b) Inserție în Exonul 1, provocând o schimbare de fază la citire .
    (c) Inserția în Exonul 7, provocând o schimbare de fază la citire.
    (d) Mutația schimbării de direcție.
    (e) Ștergere în Exonul 2, provocând o schimbare de fază de citire .
    (f) Ștergere în Exonul 2, fără modificare a fazei de citire .
    (g) Deleție mare care acoperă exonii 2 și 3.

33. Mai multe tulburări neurologice și musculare sunt asociate cu expansiuni ale secvențelor repetitive de trinucleotide. Tabelul următor enumeră câteva tulburări, modelele de repetiții, locațiile lor, numărul normal de repetiții și numărul de repetiții în mutațiile complete.
    (a) Majoritatea tulburărilor atribuibile repetițiilor trinucleotidice se datorează expansiunii repetitive . Două mecanisme distincte sunt adesea propuse pentru a explica expansiunea repetitivă : (1) sinapsisul și încrucișarea inegală și (2) erori în replicarea ADN-ului atunci când se formează bucle monocatenare cu baze pereche care intră în conflict cu replicarea liniară. Desenați o schiță simplă a fiecărui mecanism.
    (b) Rețineți că unele dintre repetiții apar în zone ale genei care nu sunt traduse. Cum poate apărea o mutație dacă modificarea nu se reflectă într-o modificare a secvenței de aminoacizi?
    (c) În ambele cazuri în care expansiunea repetată are loc în interiorul exonilor, gradul de expansiune este considerabil mai mic decât atunci când are loc în afara exonilor . Propuneți o explicație pentru această observație.

Boală	Model repetitiv	Locație	Număr normal	Mutație completă
Fragil X	CCG	Regiunea netradusă 5'	6-230	>230
Huntington	CAG	Exón	6-35	36-120
Distrofie miotonică	CFG	Regiune netradusă 3'	5-37	37-1.500
Distrofia musculară oculofaringiană	GCG	Exón	6	8-13
Ataxia lui Friedreich	AAG	Intron	20	200-900



Model care arată cum represorul *lac (în roșu) și* proteina activatoare a catabolitului (albastru închis în centrul buclei de ADN) se leagă de promotorul operonului *lac , creând o* buclă de represie formată din 93 de perechi de baze în ADN-ul reglator lac .

Reglarea expresiei genelor la procariote

CONCEPTE CAPITOL

►► **La bacterii, reglarea expresiei genelor este adesea legată de nevoile metabolice ale celulei.**

Exprimarea eficientă a informațiilor genetice la bacterii depinde de mecanisme complexe de reglare care își exercită controlul asupra transcripției .

►► **Mecanismele care reglează transcripția sunt grupate în funcție de exercitarea unui control pozitiv sau negativ asupra expresiei genelor .**

Genele procariote care codifică proteine cu funcții înrudite tind să fie organizate în grupuri și sunt adesea sub control coordonat. Astfel de grupuri, inclusiv secvențele lor reglatoare adiacente , se numesc operoni.

►► **Transcripția genelor conținute în operoni poate fi indusă sau reprimată.**

►► **Adesea , produsul metabolic final al căilor biosintetice servește ca inductor sau represor al expresiei genelor.**

lire sterline

În capitolele anterioare, am văzut cum este organizat ADN-ul în gene, cum stochează genele informațiile genetice și cum sunt exprimate aceste informații prin procesele de transcripție și traducere. Acum vom analiza una dintre cele mai importante întrebări din genetica moleculară: *cum este reglată expresia genelor?* Este clar că nu toate genele sunt exprimate în orice moment și în toate situațiile. De exemplu, analiza detaliată a proteinelor E. *coli* arată că concentrațiile celor aproximativ 4.000 de lanțuri polipeptidice codificate de genomul său variază enorm. Unele proteine sunt prezente în doar 5 până la 10 molecule pe celulă, în timp ce altele, cum ar fi proteinele ribozomale și multe dintre proteinele implicate în calea glicolitică, sunt prezente în până la 100.000 de copii pe celulă. Deși majoritatea produselor genetice procariote sunt prezente continuu la un nivel bazal (câteva copii), concentrația acestor produse poate fi crescută dramatic atunci când este necesar. Acest lucru indică în mod clar că trebuie să existe mecanisme fundamentale de reglare care controlează exprimarea informațiilor genetice.

În acest capitol, vom explora reglarea expresiei genelor la procariote. După cum am văzut în mai multe capitole anterioare, aceste organisme sunt modele excelente de cercetare în multe domenii fundamentale ale geneticii moleculare. Bacteriile au fost organisme deosebit de utile pentru cercetare din mai multe motive. În primul rând, ciclurile lor reproductive sunt extrem de scurte. Literalmente, sute de generații pot fi produse într-o singură noapte de cultivare, generând miliarde de bacterii identice genetic. În plus, se pot studia „culturi pure", permițând izolarea și investigarea separată a tulpinilor mutante de bacterii unice din punct de vedere genetic.

Pentru acest subiect, este important de subliniat faptul că bacteriile au fost, de asemenea, un sistem model excelent pentru studii privind inducerea transcripției genelor ca răspuns la schimbările condițiilor de mediu. Ne vom concentra pe reglarea la nivel genetic. Rețineți că reglarea post-transcripțională are loc și la bacterii. Cu toate acestea, vom discuta acest nivel de reglare în Capitolul 17, unde vom lua în considerare și reglarea la eucariote.

16.1

Procariotele reglează expresia genelor ca răspuns la condițiile de mediu

Reglarea expresiei genelor a fost investigată pe larg la procariote, în special la *E. coli*. Geneticienii au descoperit că aceste organisme au dezvoltat mecanisme genetice extrem de eficiente pentru a activa și dezactiva transcripția unor gene specifice, în funcție de nevoia metabolică a celulei pentru produsele genetice respective . Bacteriile nu numai că răspund la schimbările de mediu , dar reglează și activitatea genelor asociată cu diverse activități celulare nereglementate de mediu (inclusiv replicarea, recombinarea și repararea ADN-ului) și cu diviziunea celulară .

Ideea că microorganismele reglează sinteza produselor genetice nu este nouă. Încă din 1900 , s-a demonstrat că atunci când lactoza (un dizaharid care conține galactoză și glucoză) este prezentă în mediul de cultură al drojdiei , aceste organisme sintetizează enzime specifice metabolismului lactozei. Când lactoza este absentă , enzimele nu sunt produse . La scurt timp după aceea, cercetătorii au putut generaliza faptul că bacteriile se adaptează la mediul lor prin producerea anumitor enzime numai atunci când sunt prezente substraturi specifice . Aceste enzime au fost numite enzime adaptive (uneori și facultative). În schimb , enzimele care sunt produse continuu, indiferent de compoziția chimică a mediului, au fost numite enzime constitutive . De atunci, termenul *adaptiv* A fost înlocuit cu unul mai precis, inductibil , care reflectă funcția substratului ce servește ca inductor al producerii enzimei.

Cercetări mai recente au relevat un sistem opus, în care prezența unei molecule specifice inhibă exprimarea genelor . Astfel de molecule sunt de obicei produse finale ale căilor biosintetice anabolice . De exemplu , celulele bacteriene pot sintetiza aminoacidul triptofan. Dacă există o cantitate suficientă a acestui aminoacid în mediu sau în mediul de cultură, nu este eficient din punct de vedere energetic pentru celulă să sintetizeze enzimele necesare pentru producerea de triptofan. Astfel, a fost dezvoltat un mecanism prin care triptofanul joacă un rol în reprimarea transcripției ARNm necesar pentru a produce enzime care sintetizează triptofanul . Spre deosebire de sistemul inductibil care controlează metabolismul lactozei , sistemul care dirijează sinteza triptofanului se spune că este represibil .

Indiferent dacă reglarea este inductibilă sau represibilă, ea poate fi sub control pozitiv sau negativ. În cazul controlului negativ, exprimarea genelor are loc întotdeauna , cu excepția cazului în care *este oprită de un anumit tip de moleculă reglatoare* . În schimb, în controlul pozitiv , transcripția are loc *numai dacă o moleculă reglatoare stimulează direct producția de ARN.* În teorie, oricare dintre tipurile de control , sau o combinație a ambelor, poate - direcționa sistemele inductibile și represibile . Explicațiile din secțiunile următoare ale acestui capitol ne vor ajuta să

Pentru a clarifica aceste sisteme de reglare opuse. Pentru enzimele implicate în digestia lactozei și sinteza triptofanului, controlul care operează este negativ.

16.2

Metabolismul lactozei la *E. coli* este reglat de un sistem inductibil

Acumularea de dovezi genetice și biochimice privind reglarea metabolismului lactozei a început în 1946 cu studiile lui Jacques Monod și a continuat în deceniul următor cu contribuțiile importante ale lui Joshua Lederberg, François Jacob și Andre Lwoff. Aceste cercetări au furnizat informații despre modul în care activitatea genelor este reprimată atunci când lactoza este absentă și cum este indusă atunci când lactoza este prezentă. În prezența -lactozei, concentrația enzimei responsabile de metabolismul acesteia crește rapid de la câteva molecule pe celulă la mii. Prin urmare, enzima responsabilă de metabolismul lactozei este inductibilă, iar lactoza este inductorul său.

La procariote, genele care codifică enzime cu funcții conexe (de exemplu, setul de gene implicate în metabolismul lactozei) tind să fie organizate în clustere pe cromozomul bacterian , iar transcripția acestor gene este adesea sub controlul coordonat al unei singure unități de reglare. Această regiune de reglare este aproape întotdeauna situată în amonte (5') de clusterul de gene pe care îl controlează. Deoarece regiunea de reglare se află pe aceeași catenă ca aceste gene, o numim situs cis. Regiunile de reglare *cis* se leagă de molecule care controlează transcripția clusterului de gene. Aceste molecule se numesc elemente trans . Evenimentele care au loc la situsul de reglare determină dacă genele sunt transcrise în ARNm și, prin urmare , dacă enzimele sau alte molecule corespunzătoare pot fi sintetizate.

 produse proteice din informația genetică conținută în ARNm . Legarea unui element transactiv Un situs de acțiune *cis* -legat poate regla grupul de gene atât negativ (prin dezactivarea transcripției) , cât și pozitiv (prin activarea transcripției genelor din grup). În această secțiune, vom explica modul în care transcripția acestor grupuri de gene bacteriene este reglată într-un mod coordonat .

Descoperirea unei gene reglatoare și a unui situs reglator care fac parte din clusterul de gene a fost de o importanță capitală în înțelegerea modului în care expresia genelor este controlată în sistem. Niciunul dintre aceste elemente reglatoare nu codifică enzimele necesare pentru metabolismul lactozei , care este funcția celor trei gene din cluster. Așa cum este ilustrat în Figura 16.1, cele trei gene structurale și situsul reglator adiacent constituie operonul lactozei , sau operonul *lac* . În ansamblu, întregul grup lucrează într-un mod integrat pentru a oferi un răspuns rapid la prezența sau absența lactozei.

Genele structurale

Genele care codifică *structura* primară a enzimelor se numesc gene structurale. Operonul lac Are trei gene structurale . Gena *lacZ* Prima genă codifică /J galactozidaza, o enzimă a cărei funcție principală este de a converti dizaharida lactoză în monozaharide glucoză și galactoză (Figura 16.2). Această conversie este esențială pentru ca lactoza să servească drept sursă principală de energie în glicoliză . A doua genă , lacY , *codifică* structura primară a permeazei, o enzimă care facilitează intrarea lactozei în celula bacteriană . A treia *genă* , *lacA* , Codifică enzima transacetilază. Deși funcția sa fiziologică nu este pe deplin înțeleasă , ar putea fi implicată în eliminarea din celulă a produselor secundare toxice ale digestiei lactozei .

Pentru a studia genele care codifică aceste trei enzime, cercetătorii au izolat numeroase mutații care elimină funcția uneia sau mai multor enzime. Joshua Lederberg a fost primul care a izolat și studiat acești mutanți *lac* . Celule mutante care nu pot produce L-galactozidază

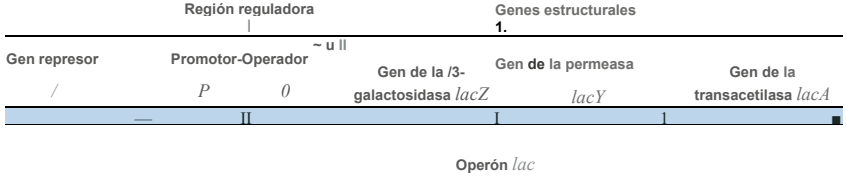


FIGURA 16.1 Resumen simplificado de los genes y unidades reguladoras implicados en el control del metabolismo de la lactosa. (Las regiones de ADN no están representadas a escala.) Más adelante en el capítulo se desarrollará un modelo más detallado *(véase* la Figura 16.10).

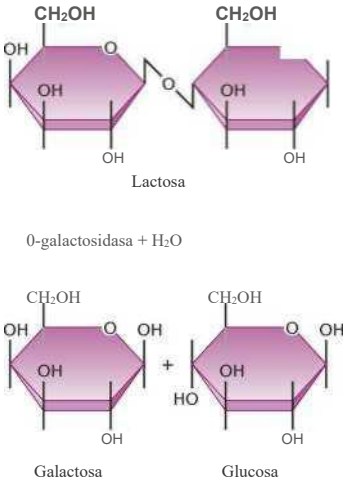
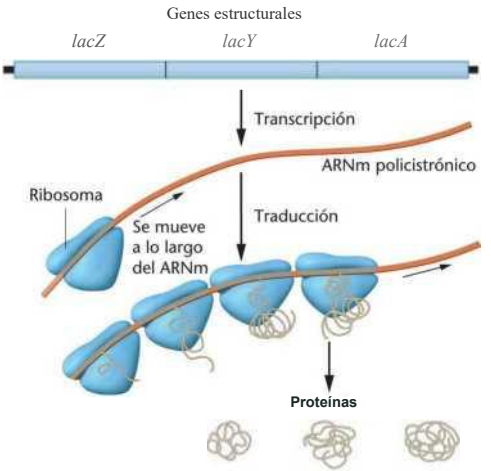


FIGURA 1 6.2 Conversia catabolică a dizaharidei lactoză în monozaharidele care o formează, galactoză și glucoză.



. Figura 16.3 prezintă genele structurale ale operonului *lac* . Acestea sunt transcrise într-un singur ARNm policistronic, care este tradus simultan de diverși ribozomi în cele trei enzime codificate de operon.

lactozei (lacZ~) sau permeazei *(lacY~)* nu pot utiliza lactoza ca sursă de energie. De asemenea, au fost descoperite mutații în gena transacetilazei. Studiile cartografice efectuate de Lederberg au stabilit că cele trei gene sunt strâns legate sau contigue în cadrul cromozomului bacterian, urmând ordinea ZYA *(vezi Figura* 16.1).

Cunoașterea legăturii lor strânse a condus la o altă descoperire relevantă despre ceea ce avea să fie cunoscut mai târziu sub numele de reglarea genelor structurale : cele trei gene sunt transcrise ca o singură unitate, rezultând ceea ce se numește *ARNm policistronic.* (Figura 16.3; reamintim că *cistronul* se referă la porțiunea unei secvențe de nucleotide care codifică o singură genă). Prin urmare, cele trei gene sunt reglate într-un mod coordonat , deoarece același ARN mesager servește drept bază pentru traducerea simultană a celor trei produse genetice.

Descoperirea mutațiilor reglatoare

Cum stimulează lactoza transcripția operonului *lac* și cum induce sinteza enzimelor pe care le codifică acest operon ? Studiile care utilizează inductori liberi, analogi chimici ai lactozei , cum ar fi analogul care conține sulf izopropiltiogalactozidă (IPTG), prezentate în Figura 16.4, oferă un răspuns parțial. Inductorii liberi se comportă ca inductorii naturali, dar nu servesc ca substraturi pentru enzimele codificate de operonul lac

enzime care sunt sintetizate. Descoperirea lor oferă dovezi puternice că inducția inițială *nu* depinde de interacțiunea dintre inductor și enzimă.

Care este, așadar, rolul lactozei în inducție ? Răspunsul la această întrebare necesită examinarea unui tip de mutație numită mutație constitutivă . În celulele cu acest tip de mutație, enzimele sunt produse indiferent de prezența sau absența lactozei. Studiile mutației constitutive *lad* au permis cercetătorilor să cartografieze mutația și să o localizeze pe un situs cromozomial bacterian aproape, dar nu exact adiacent , genelor structurale *lacZ, lacY* și *lacA.* Această mutație i-a condus pe cercetători la descoperirea *genei lacI,* denumită în mod potrivit gena represoare. Există un al doilea set de mutații constitutive care produc aceleași efecte și sunt localizate...

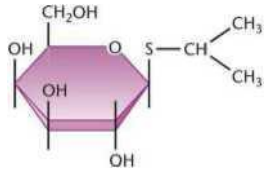


FIGURA 16.4 Inductor liber izopropiltiogalactozidă (IPTG).

într-o regiune adiacentă genelor structurale. Aceste tipuri de mutații, numite *lac O ᶜ* , se găsesc în regiunea operatorului a operonului. Deoarece în ambele tipuri de mutanți constitutivi enzimele sunt produse continuu , capacitatea de inducție a fost eliminată și reglarea genetică s-a pierdut.

Modelul operonului EE: control negativ

În 1960, Jacob și Monod au propus un mecanism ipotetic de control negativ al reglării numit modelul operonului, în care un grup de gene este reglat și exprimat ca o unitate. După cum se vede în Figura 16.1, operonul *lac* pe care l-au propus este format din genele structurale Z, Y și A și din secvențele de ADN adiacente cunoscute sub numele de *regiunea operatorului.* Acești oameni de știință au susținut că gena *laci* reglează transcripția genelor structurale prin producerea unei molecule represoare și că represorul este alosteric, ceea ce înseamnă că este o moleculă care poate interacționa cu o altă moleculă în mod reversibil, suferind atât o modificare conformațională a formei sale tridimensionale, cât și o modificare a activității sale chimice. Figura 16.5 ilustrează componentele operonului tac și acțiunea represorului *lac* în prezența și absența lactozei.

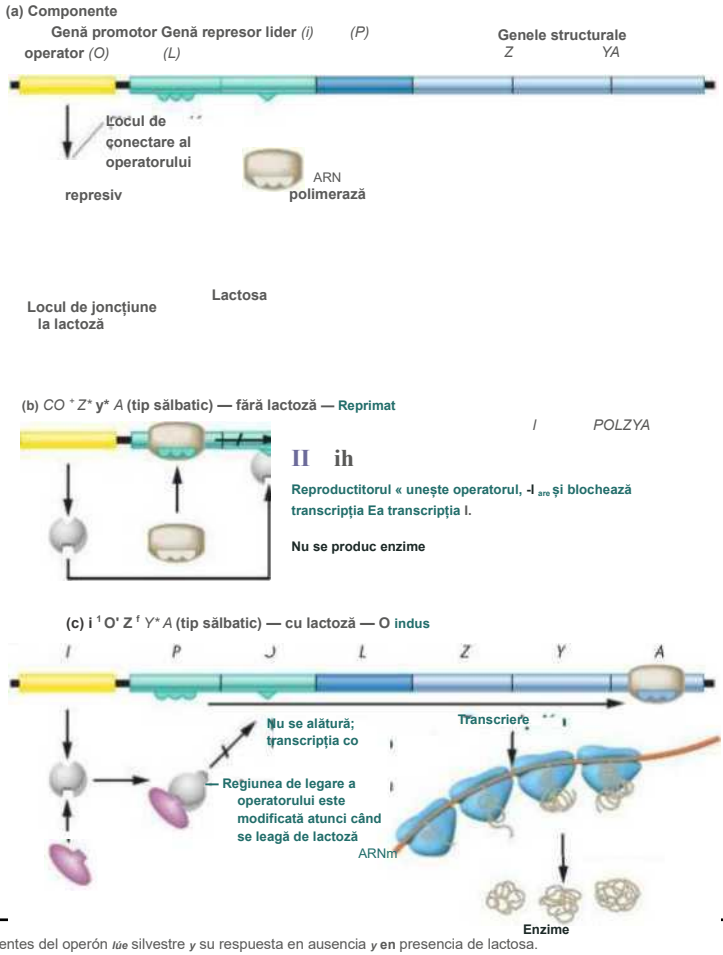

(a) Componente
Genă promotor Genă represor lider (i) (P)
operator (O) (L)
Genele structurale
Z YA
Locul de conectare al operatorului represiv
ARN polimerază
Locul de joncțiune la lactoză
Lactosa
(b) CO ᶜ Z* y* A (tip sălbatic) — fără lactoză — Reprimat
I POLZYA
II ih
Reproductitorul « unește operatorul, -I are și blochează transcripția Ea transcripția I.
Nu se produc enzime
(c) i ¹ O' Z ᶠ Y* A (tip sălbatic) — cu lactoză — O indus
I P J L Z Y A
Nu se alătură; transcripția co
Transcriere
— Regiunea de legare a operatorului este modificată atunci când se leagă de lactoză
ARNm
Enzime

FIGURA 1 6.5 Componentes del operón *lüe* silvestre *y* su respuesta en ausencia *y* **en** presencia de lactosa.

FIGURA 1 6.5 Componentes del operón *lúe* silvestre *y* su respuesta en ausencia *y* **en** presencia de lactosa.

Jacob și Monod au sugerat că represorul se leagă în mod normal de secvența de ADN a regiunii operatorului . Procedând astfel, inhibă acțiunea ARN polimerazei, reprimând eficient transcripția genelor structurale [Figura 16.5(b)]. Cu toate acestea , atunci când este prezentă lactoza, acest zahăr se leagă de represor, provocând o modificare alosterică (conformală). Această modificare modifică situsul de legare al represorului , împiedicându-l să interacționeze cu operatorul ADN [Figura 16.5(c)]. În absența interacțiunii represor - operator , ARN polimeraza transcrie genele structurale, iar enzimele necesare pentru metabolismul lactozei sunt produse . Deoarece transcripția are loc numai atunci când represorul nu este legat de regiunea operatorului, se spune că reglarea este sub control negativ .

În concluzie, modelul operonului utilizează o serie de interacțiuni între proteine, inductori și ADN pentru a explica - reglarea eficientă a expresiei genelor structurale . În absența lactozei , enzimele codificate de aceste gene nu sunt necesare , iar expresia lor este reprimată. Când lactoza este prezentă, aceasta induce indirect activarea genelor prin legarea la represor*. Dacă toată lactoza este metabolizată, nu mai rămâne lactoză care să se lege de represor, care se poate apoi lega din nou de ADN-ul operatorului pentru a reprima transcripția.

Mutațiile constitutive *i* și Oc interferează cu aceste interacțiuni moleculare, permițând transcripția continuă a genelor structurale. În cazul mutanților *I* , prezentați în Figura 6.6(a), proteina represor este alterată sau absentă și nu se poate lega de regiunea operatorului, astfel încât genele structurale sunt întotdeauna activate. În cazul mutantului O^c [Figura 16.6(b)], secvența de nucleotide a ADN-ului operatorului este alterată și nu se poate lega de o moleculă represoare normală. Rezultatul este același: genele structurale sunt întotdeauna transcrise,

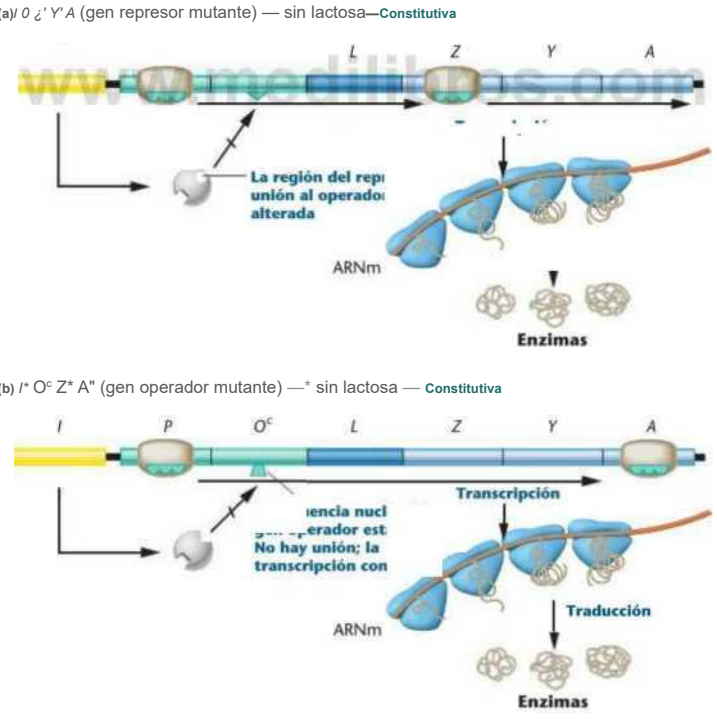


FIGURA 1 6.6 Respuesta del operón *tac* en ausencia de lactosa cuando la célula tiene una mutación J^1 (|O^c.

Testul genetic al modelului operonului

Modelul operonului este deosebit de bun deoarece conduce la trei predicții importante care pot fi testate pentru a le determina validitatea. Aceste predicții sunt: (1) gena *I* (1) produce un produs celular difuzibil (adică un *produs cu acțiune trans); (2)* regiunea O este implicată în reglare, dar nu generează niciun produs; și (3) regiunea *O* trebuie să fie adiacentă genelor structurale pentru a regla transcripția acestora.

Crearea de bacterii parțial diploide ne permite să testăm aceste presupuneri, în special pe cele care prezic prezența elementelor reglatoare cu acțiune trans . De exemplu, plasmida F poate conține gene cromozomiale (Capitolul 6), caz în care se numește F'. Când o celulă F' achiziționează una dintre aceste plasmide, aceasta conține propriul cromozom și una sau mai multe gene suplimentare prezente pe plasmidă. Prin urmare, această celulă gazdă este un merozigot, o celulă care este diploidă pentru anumite gene adăugate (dar nu și pentru restul cromozomului). Utilizarea acestor plasmide face posibilă, de exemplu, introducerea unei gene *într- o* celulă gazdă cu genotipul *I ' sau introducerea unei* regiuni *O** într-o celulă gazdă cu genotipul Oc . Modelul operonului Jacob-Monod prezice modul în care va fi afectată reglarea în aceste celule. 1.a Adăugarea unei gene *F la o* celulă *F* Ar trebui să restabilească capacitatea de inducție , deoarece gena *I* inserată* ar produce represorul normal de tip sălbatic, care este un factor transactiv . Invers, adăugarea unei regiuni O' la o *celulă O* Nu ar trebui să aibă niciun efect asupra producției constitutive a enzimelor, deoarece reglarea depinde de o regiune O^+ imediat adiacentă genelor structurale; adică, O^+ Este un actuator cis .

Tabelul 16.1 prezintă rezultatele acestor experimente , unde Z reprezintă genele structurale (genele inserate sunt listate după eticheta F'). În cele două cazuri descrise mai sus, rezultatele sunt în concordanță cu modelul Jacob-Monod (Partea B a Tabelului 16.1). Partea C prezintă experimentele reciproce, în care o *genă F sau* o regiune 0' este adăugată la celule cu genotipuri inductibile normale. Așa cum prezice modelul, aceste diploide parțiale își păstrează capacitatea de inducție.

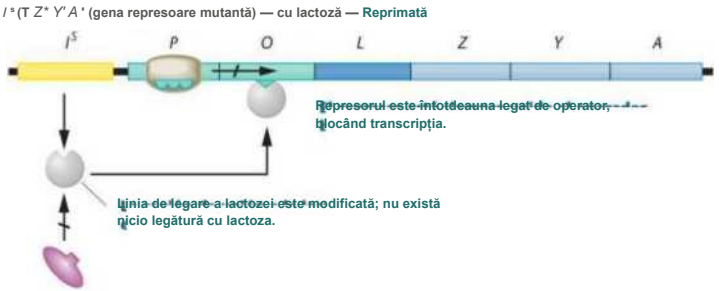
O altă predicție a modelului operonului este că anumite mutații ale genei / ar trebui să aibă efectul opus față de cele ale *genei I.* Adică, în loc să fie mutații constitutive deoarece represorul nu se poate lega de operator, ar trebui produse molecule represoare mutante care nu pot interacționa cu inductorul, lactoza. În consecință, acești represori ar fi întotdeauna legați de secvența operatorului, iar genele structurale ar fi reprimate permanent. În astfel de cazuri, prezența unei gene *F suplimentare* ar avea un efect foarte mic asupra represiunii sau deloc.

De fapt, așa cum se arată în partea D a tabelului 16.1 (și este ilustrat în figura 16.7), a fost descoperită o mutație

TABLA 16.1 Compararea activității genice (+ sau —) în prezența și absența lactozei pentru diferite genotipuri *de E. coti*

Genotip	Prezența activității β1-gatactozidazei	Absența lactozei
	Prezența lactozei	
río'z*	4*	—
A. roz	—	—
/ oz	4-	4-
anul *	+	+
B. / OZ*/F7'	4-	—
Ce criE'o *	4-	+
c. Fo*z*/Fr	+	—
rcFz*/E'cf	4-	—
D. FcFz*	—	—
I^Q-riFT	—	—

Notă: În părțile B, C și D, majoritatea genotipurilor sunt parțial diploide, conținând un factor F cu gene legate (F'j).



cum ar fi cea tocmai descrisă , numită Is , în care operonul este „super-reprimat". O genă I* suplimentară nu scade eficient represia activității genelor. Aceste observații sunt în concordanță cu ideea că represorul conține domenii separate de legare a ADN - ului și de legare a inductorului .

Izolarea asupritorului

teoria operonului Jacob - Monod explica în mod satisfăcător multe aspecte ale reglării genelor la procariote, natura moleculei represoare era încă necunoscută când a fost publicat acest articol de referință în 1961. Aceștia au emis ipoteza că represorul alosteric era o proteină, dar ARN-ul era, de asemenea, un posibil candidat, deoarece activitatea moleculei necesita capacitatea de a se lega de ADN. În ciuda numeroaselor încercări de a izola și caracteriza ipotetica moleculă represoare, nu s-au obținut dovezi chimice imediate. O singură celulă *de E. coli* conține nu mai mult de zece molecule de represor *lac* , iar identificarea chimică directă a zece molecule dintr- o populație de milioane de proteine și ARN-uri prezente într-o singură celulă reprezintă o provocare extraordinară.

În 1966, Walter Gilbert și Benno Müller-Hill au raportat - izolarea represorului *lac* într-o formă parțial purificată. Pentru a realiza această izolare, au utilizat o tulpină mutantă care conținea de aproximativ 10 ori mai mult regulator *(γ') decât celulele E. coli de tip sălbatic.* Utilizarea inductorului liber IPTG, care se leagă de represor, și utilizarea dializei de echilibru au contribuit, de asemenea, la izolarea represorului . În această tehnică, extracte de celule *F* au fost plasate Cultura celulară a fost plasată într -o pungă de dializă și lăsată să atingă echilibrul cu o soluție externă de IPTG radioactiv, o moleculă suficient de mică pentru a difuza liber în și din pungă . La echilibru , concentrația de IPTG radioactiv a fost mai mare în interiorul pungii decât în soluția externă, indicând faptul că extractul celular conținea un material care leagă IPTG și că acest material era suficient de mare pentru a preveni difuzia prin peretele pungii.

, materialul de legare *a IPTG* a fost purificat și s-a demonstrat că are diverse caracteristici proteice . În schimb, extractele de celule *I~* au prezentat o expresie constitutivă datorită absenței *activității* represoare lac . Nu prezintă nicio legare la IPTG, ceea ce sugerează cu tărie că proteina izolată a fost molecula represoară.

Pentru a confirma acest lucru, Gilbert și Müller-Hill au crescut celule de E. *coli* într-un mediu care conține sulf radioactiv și apoi au izolat proteina care leagă IPTG , ai cărei aminoacizi care conțin sulf au fost marcați. Această proteină a fost amestecată cu ADN dintr-o tulpină de fag lambda (X) care conține *gena lacO'.* Dacă cele două substanțe nu au fost amestecate, ADN-ul a sedimentat la 405°C, în timp ce proteina care leagă IPTG a sedimentat la 75°C. Cu toate acestea , când ADN-ul și proteina au fost amestecate și sedimentate pe un gradient prin ultracentrifugare, proteina radioactivă a sedimentat în aceeași viteză ca și ADN-ul, indicând faptul că această proteină se leagă de ADN. Experimente suplimentare au arătat că proteina care leagă IPTG, proteina represor, se leagă doar de ADN-ul care conține regiunea *lac* și nu se leagă de ADN-ul *lac* care conține o mutație constitutivă a operatorului (Oc).

ACUM REZOLVĂ ASTA

16.1 Chiar dacă genele structurale *lacZ, Y* și *A* sunt transcrise ca un singur ARNm policistronic, fiecare genă conține semnalele esențiale de inițiere și terminare pentru translație. Preziceți ce s-ar întâmpla atunci când o celulă care crește în prezența lactozei conține o deleție a unui nucleotid (a) la unul dintre situsurile de inițiere ale genelor *Z* și *Y.* (b) într -una dintre locațiile inițiale ale genei *A.*

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să combinăm înțelegerea expresiei genei operonului lac cu cea a codului genetic , a mutațiilor de schimbare de fază și a procesului de terminare a transcripției . Cheia rezolvării acesteia este de a lua în considerare efectul pe care pierderea unui nucleotid îl are asupra unui ARNm policistronic .*

16.3

Proteina activatoare de catabolit (CAP) exercită un control pozitiv asupra operonului *lac*

Așa cum s -a descris în discuția anterioară despre operonul lac , Funcția β1 - galactozidazei este de a descompune lactoza în componentele sale, glucoză și galactoză. Apoi, pentru ca celula să poată utiliza galactoza, aceasta este transformată înapoi în glucoză . Ce se întâmplă când celula se află într -un mediu care conține cantități mari de lactoză *și* de glucoză? Întrucât glucoza este sursa preferată de carbon pentru E. *coli,* nu ar fi eficient din *punct* de vedere energetic pentru celulă să inducă transcripția operonului lac , deoarece ceea ce are nevoie de fapt (glucoza) este deja prezent. După cum vom vedea mai jos, există o altă componentă moleculară implicată în reprimarea eficientă a expresiei operonului *lac* . Când este prezentă glucoză , proteina activatoare de catabolit (CAP) este inhibată. Această inhibare se numește represie catabolică.

Pentru a înțelege CAP și rolul său în reglare, să ne întoarcem puțin pentru a analiza sistemul ilustrat în Figura 16.5. Când represorul *lac* este legat de inductor (lactoză), operonul *lac* este activat, iar ARN polimeraza transcrie genele structurale. Așa cum s-a menționat în Capitolul 14, transcripția este inițiată prin legarea ARN polimerazei la secvența de nucleotide a regiunii promotorului, care este situată în amonte (5') de secvența codificatoare inițială. În *operonul lac,* promotorul este situat între gena *I* și regiunea operatorului (O) *(vezi* Figura 16.1). O examinare atentă a relevat că legarea polimerazei nu este niciodată foarte eficientă, cu excepția cazului în care este prezent și CAP pentru a facilita procesul.

Figura 16.8 rezumă acest mecanism. În absența glucozei și în condiții de inducție, CAP exercită un control pozitiv prin legarea la situsul de legare CAP, ceea ce facilitează legarea ARN polimerazei la promotor și, în consecință, promovează transcripția. Prin urmare, pentru ca rata de transcripție a genelor structurale să fie maximă, represorul trebuie să fie legat de lactoză (astfel încât să nu reprime expresia operonului), iar CAP trebuie să fie legat de situsul de legare CAP .

Aceasta duce la întrebarea centrală despre CAP. Cum inhibă prezența glucozei legarea CAP? Răspunsul implică o altă moleculă, adenozin monofosfat ciclic (AMPc), de care depinde legarea CAP. *Pentru ca legarea la promotor să aibă loc, CAP trebuie să fie legat de AMPc.* Nivelul de AMPc depinde de o enzimă, adenilat ciclază, care catalizează conversia ATP în AMPc *(vezi* Figura 16.9) †††††. Rolul glucozei în represia catabolitului este acum clar: aceasta inhibă activitatea adenilat ciclazei, ducând la o scădere a nivelului de AMPc din celulă. În aceste condiții, CAP nu poate forma complexul CAP-AMPc, care este esențial pentru controlul pozitiv al transcripției operonului lac .

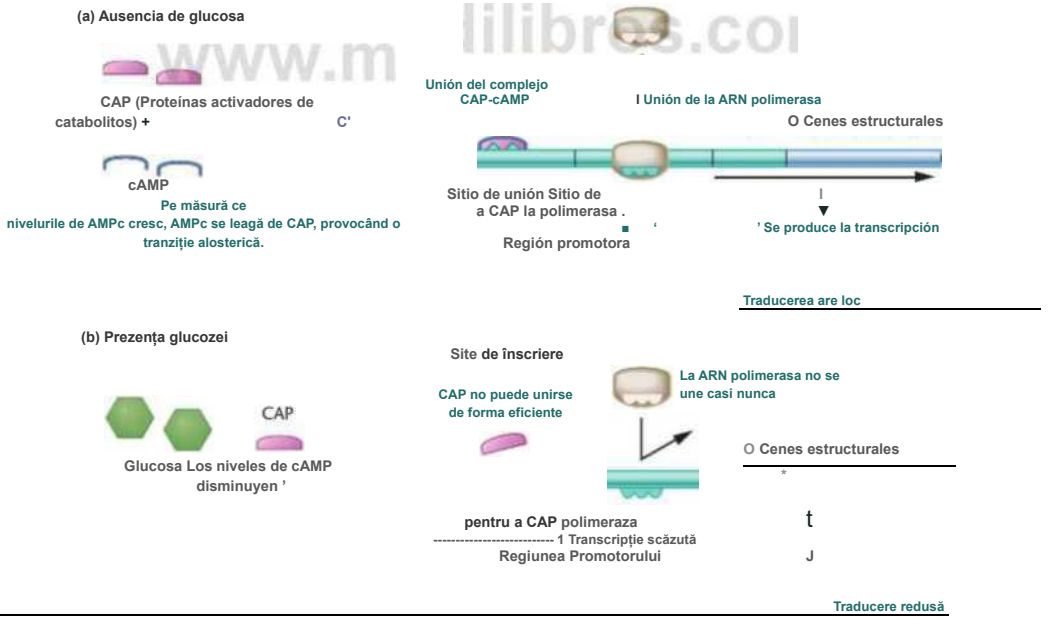

(a) Ausencia de glucosa
CAP (Proteínas activadores de catabolitos) +
cAMP
Pe măsură ce nivelurile de AMPc cresc, AMPc se leagă de CAP, provocând o tranziție alosterică.
Unión del complejo CAP-cAMP
I Unión de la ARN polimerasa
O Cenes estructurales
Sitio de unión Sitio de a CAP la polimerasa .
Región promotora
' Se produce la transcripción
Traducerea are loc
(b) Prezența glucozei
CAP
Glucosa Los niveles de cAMP disminuyen '
Site de înscriere
CAP no puede unirse de forma eficiente
La ARN polimerasa no se une casi nunca
O Cenes estructurales
pentru a CAP polimeraza
1 Transcripție scăzută
Regiunea Promotorului
Traducere redusă

FIGURA 16.8 Represia catabolitului, (a) În absența glucozei, nivelurile de AMPc cresc, rezultând formarea complexului AMPc-CAP, care se leagă de situsul CAP al promotorului, stimulând transcripția, (b) În prezența glucozei, nivelurile de AMPc scad, complexul AMPc-CAP nu se formează și transcripția nu este stimulată.

††††† Datorită relației sale cu AMPc, CAP este numită și proteina receptorului *AMP ciclic* . (CRP) , iar gena care o codifică se numește *crp.* Întrucât prima denumire dată acestei proteine a fost CAP, vom folosi nomenclatura inițială.

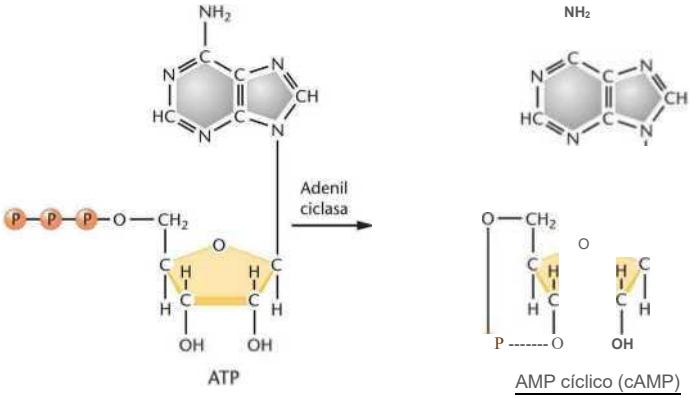


FIGURA 16.9 Formarea AMPc din ATP, catalizată de adenilat ciclază.

La fel ca *represorul lac,* CAP și cAMP-CAP au fost examinate folosind cristalografia cu raze X. CAP este un dimer care se inserează în regiunile adiacente ale secvenței specifice de nucleotide de ADN care constituie *promotorul lac.* Când este legat de ADN, complexul cAMP-CAP curbează această moleculă, determinând-o să adopte o nouă conformație.

Experimentele de legare în soluție au clarificat în continuare mecanismul de activare genică . Nici cAMP -CAP , nici ARN polimeraza nu au o tendință puternică de a se lega singure de ADN-ul promotorului lac și nici nu au *o* afinitate mare una pentru cealaltă. Cu toate acestea, atunci când cele două sunt împreună în prezența *ADN-ului promotorului lac,* se formează un complex compact de legare, un exemplu de ceea ce este cunoscut în termeni biochimici sub numele de legare cooperativă. În cazul cAMP-CAP și al operonului lac , acest fenomen ilustrează gradul ridicat de specificitate implicat în reglarea genetică a unui singur grup mic de gene.

Reglarea operonului *lac* prin represia catabolică duce la o utilizare eficientă a energiei, deoarece prezența glucozei va reprima metabolismul lactozei chiar și atunci când glucoza este disponibilă celulei . Spre deosebire de reglarea negativă exercitată de *represorul lac,* acțiunea cAMP-CAP constituie o reglare pozitivă. Prin urmare, o combinație de mecanisme de reglare pozitive și negative - determină nivelurile de transcripție ale *operonului lac.* Represia catabolică care implică CAP a fost observată și la alți operoni inductibili , inclusiv cei care controlează metabolismul galactozei și arabinozei .

ACUM REZOLVĂ ASTA

16.2 Preziceți nivelul activității genetice a operonului *lac* , precum și starea *represorului lac* și a proteinei CAP din afecțiuni celulare enumerate în tabelul următor.

	Lactoză	Glucoză
(la)	—	—
(b)	+	—
(c)	—	+
(d)	+	+

■ **SUGESTIE:** *această problemă* *Ne cere să combinăm conurile noastre-*

Fundamentul modelului Jacob-Monod de reglare a operonului lac constă în înțelegerea modului în care represia catabolică afectează acest model. Cheia pentru rezolvarea acestei probleme este să ne amintim că reglarea lactozei este un sistem de control negativ, în timp ce reglarea care implică glucoză și represia catabolică este un sistem de control pozitiv.

16.4

Analiza structurii cristaline a complexelor represoare a confirmat modelul operonului

În prezent, avem o înțelegere detaliată a naturii biochimice a regiunii de reglare a *operonului lac,* inclusiv locațiile relative precise ale diferitelor sale componente (Figura 16.10). În 1996, Mitchell Lewis, Ponzy Lu și colegii săi au determinat cu

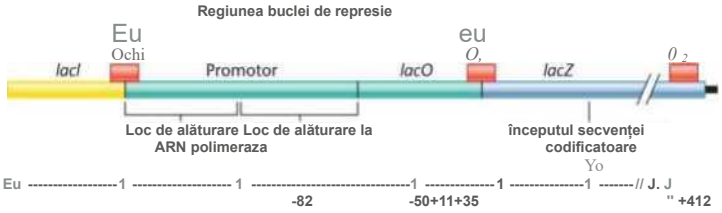


FIGURA 16.10 Diversele regiuni de reglare implicate în controlul expresiei genice a *operonului lac,* așa cum sunt descrise în text. Numerele de pe scara inferioară reprezintă situsurile nucleotidice în amonte și în aval de situsul de inițiere a transcripției.

Structura cristalină a *represorului lac,* precum și structura represorului legat de inductor și de ADN-ul operatorului, au fost determinate cu succes . Prin urmare, informațiile anterioare bazate pe date genetice și biochimice au fost acum completate de interpretarea structurală lipsă. Împreună, aceste contribuții oferă o imagine aproape completă a reglării operonului.

Represorul, care este produsul genetic al genei /, este un monomer format din 360 de aminoacizi. În cadrul acestuia Regiunea de legare a inductorului a fost identificată în monomer [Figura 16.11(a)]. Deși dimerii [Figura 16.11(b)] se pot lega și de inductor, represorul funcțional este un homotetramer (adică conține patru copii ale monomerului). Tetramerul poate fi scindat cu o protează în condiții controlate , rezultând cinci fragmente. Patru dintre acestea provin de la capetele N - terminale ale tetramerului, care se leagă de ADN-ul operatorului. Al cincilea fragment este nucleul rămas al tetramerului, provenind de la

www.medilibros.com

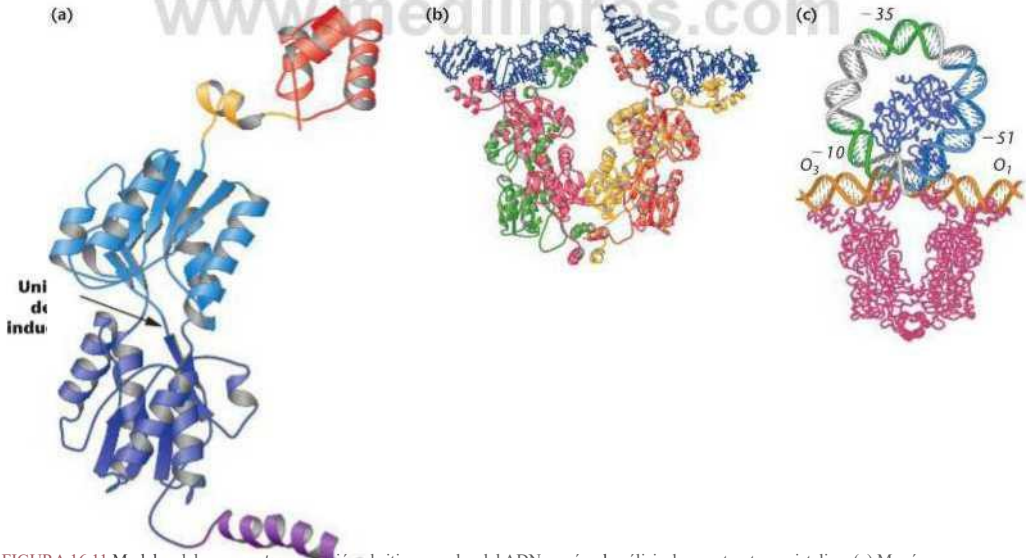


FIGURA 16.11 Modelos del represor *lac y* su unión al sitio operador del ADN, según el análisis de su estructura cristalina, (a) Monómero represor, que muestra el sitio de unión al inductor. La región de unión al ADN se muestra en rojo, (b) Dímero represor unido a dos segmentos de 21 pares de bases del ADN operador (se muestra en azul), (c) Represor (en rosa) y CAP (en azul oscuro) unidos al ADN de *lac.* La unión a las regiones operadoras O, y O_3 crea un lazo de represión de 93 pares de bases del ADN promotor.

capetele COOH-terminale și este cel care se leagă de lactoză și de inductorii liberi, cum ar fi IPTG. Analiza a relevat că, în orice moment dat, fiecare tetramer se poate lega de două helixuri simetrice de ADN operator.

ADN-ul operatorului, definit anterior prin studii de mutație *(lacO c)* și confirmat prin analiza secvențierii ADN-ului, este situat chiar în amonte de începutul secvenței codificatoare propriu-zise a *genei lacZ,* chiar lângă aceasta. Studiile cristalografice arată că regiunea de legare a represorului propriu-zisă a acestui operator primar, *O1,* constă din 21 de perechi de baze. După cum se arată în Figura 16.10, au fost identificate alte două regiuni auxiliare ale operatorului. Una dintre acestea, denumită O2 , este situată la 401 perechi de baze în aval de operatorul primar, în cadrul *genei lacZ.* Cealaltă, denumită O1 , este situată la 93 de perechi de baze în amonte de O2 , imediat după situsul CAP. *In vivo ,* pentru o represie maximă, toți cei trei operatori trebuie să-și fi format situsurile de legare respective.

Legarea simultană a represorului la două situsuri ale operatorilor distorsionează conformația ADN-ului, determinându-l să se îndoaie în direcția opusă represorului. Când se creează un model pentru a ilustra legarea dual a operatorilor Û! și o3 [Figura 16.1 1(c)], cele 93 de perechi de baze de ADN dintre ele ies în evidență, formând ceea ce se numește o buclă de represie. În acest model, regiunea promotorului care se leagă de ARN polimerază se află în interiorul buclei, împiedicând-o să fie accesibilă în timpul represiei. Mai mult, bucla de represie poziționează situsul de legare CAP astfel încât, după inducție, facilitează interacțiunea CAP cu ARN polimeraza. Bucla de ADN cauzată de represie în acest model este similară cu modificările configurationale prezise a avea loc în sistemele eucariote *(vezi* Capitolul 17).

modificările conformaționale tridimensionale care însoțesc interacțiunile cu moleculele inductoare. Luate împreună, studiile cristalografice oferă un nou nivel de înțelegere a procesului de reglare care are loc în *operonul lac,* confirmând descoperirile și predicțiile modelului stabilit de Jacob și Monod în urmă cu mai bine de 40 de ani, bazat strict pe date genetice.

16,5

triptofan *(trp)* din E. *coli* este un sistem genetic represat

Deși procesul de inducție era cunoscut de ceva vreme , abia în 1953 Monod și colaboratorii săi au descoperit un operon reprezibil. E. *coli de tip sălbatic* poate produce enzimele necesare, esențiale pentru biosinteza aminoacizilor, precum și a altor macromolecule esențiale . Monod și-a concentrat cercetările asupra aminoacidului triptofan și a enzimei triptofan sintază și a descoperit că, dacă există o cantitate suficientă de triptofan în mediul de cultură , enzimele necesare pentru sinteza acestuia nu sunt produse . Este avantajos din punct de vedere energetic pentru bacterii să reprime expresia genelor implicate în sinteza triptofanului atunci când există o cantitate suficientă de triptofan în mediul de cultură .

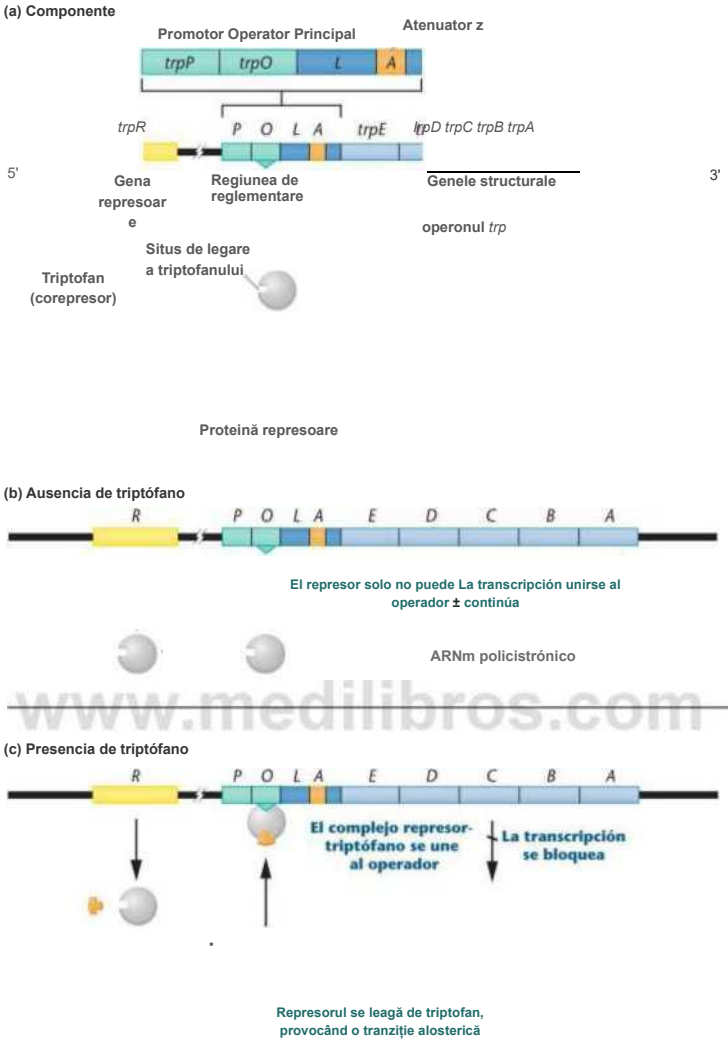
Alte investigații au arătat *că* , în cromozomul E. coli , Sinteza triptofanului implică o serie de enzime codificate de cinci gene contigue. Aceste gene fac parte dintr -un operon și, în prezența triptofanului , toate sunt reprimate într-un mod coordonat , fără ca niciuna dintre aceste enzime să fie produsă . Datorită marii - asemănări dintre această represie și inducerea enzimatică în metabolismul lactozei , Jacob și Monod au propus un model de reglare genică analog cu cel al sistemului *lac* (versiunea actualizată este prezentată în Figura 16.12).

Pentru a explica represia , Jacob și Monod au sugerat prezența unui represor *în mod normal inactiv,* care de unul singur nu poate interacționa cu regiunea operatorului a operonului. Cu toate acestea , acest represor este o moleculă alosterică ce se poate lega de triptofan. În prezența triptofanului, complexul represor-triptofan rezultat adoptă o nouă conformație care se leagă de operator, reprimând transcripția . Astfel , dacă este prezent triptofanul - produsul final al acestei căi anabolice - sistemul este reprimat , iar enzimele nu sunt sintetizate . Deoarece complexul de reglare inhibă transcripția operonului , acest sistem represibil se află sub control negativ. Și, deoarece triptofanul participă la represie, în cadrul acestei scheme de reglare se numește corepresor.

operonului *trp*

Dovezile care susțin conceptul de operon represabil au devenit curând disponibile , inițial bazate pe izolarea a două tipuri diferite de mutații constitutive . Primul tip, *trpR~* , este situat la o distanță considerabilă de genele structurale. Acest locus reprezintă gena care codifică represorul . Mutația inhibă posibil interacțiunea represorului cu triptofanul sau inhibă complet formarea represorului . *În orice caz* , în celulele mutante trpR Represiunea nu are loc niciodată . Așa cum era de așteptat , dacă gena *trpR* ' codifică o moleculă represoare funcțională; prezența unei copii a acestei gene restabilește capacitatea de reprimare .

A doua mutație constitutivă este analoagă cu cea a operatorului operonului lactoză, deoarece este situată imediat adiacent genelor structurale . În plus, adăugarea unei gene operatoare de tip sălbatic la celulele mutante (ca element extern) nu restabilește represia . Aceasta este ceea ce ar fi de așteptat dacă operatorul mutant nu ar mai putea interacționa cu complexul represor -triptofan.



www.medilibros.com

FIGURA 16.12 Un operon represibil. (a) Componente implicate în reglarea operonului triptofan. (b) În absența triptofanului, se produce un represor inactiv care nu se poate lega de operatorul (O), permițând transcripția. (c) În prezența triptofanului , acesta se leagă de represor, provocând o transformare alosterică. Acest complex se leagă de regiunea operatorului , ducând la represia operonului .

Operonul *trp* complet este acum bine definit , așa cum se arată în Figura 16.12. Cele cinci gene structurale contigue *(trpE, D, C, B* și A) sunt transcrise ca un mesaj policistronic care direcționează traducerea enzimelor care catalizează biosinteza triptofanului. La fel ca operonul lac , *acesta* are o regiune promotor *(trpP)* care reprezintă situsul de legare pentru ARN polimerază și o regiune operator *(trpO) de care* se leagă represorul . În absența legării represorului, transcripția începe în regiunea *trpP-trpO* și continuă de-a lungul unei secvențe lider , la 162 de nucleotide în amonte de prima genă structurală *(trpE). În cadrul acestei secvențe lider,* a fost

găsit un alt situs de reglare , numit *atenuator,* pe care îl vom discuta în secțiunea următoare. După cum vom vedea, această unitate de reglare este o parte esențială a mecanismului de control al acestui operon.

16.6

Atenuarea este un proces crucial în reglarea operonului *trp* în *E. coli*

În secțiunea anterioară, am stabilit că genele din operonul trp sunt exprimate doar atunci când triptofanul *este* foarte limitat în celulă, dar că sunt reprimate în prezența triptofanului. Cu toate acestea, în prezența unor niveluri scăzute de triptofan, transcripția regiunii din amonte a operonului putea fi totuși inițiată. Charles Yanofsky, Kevin Bertrand și colaboratorii lor au descoperit acest lucru realizând că, odată ce transcripția a început, exista un mecanism independent care, în prezența triptofanului, reprima expresia operonului. Ei au numit acest mecanism atenuare, un cuvânt derivat din verbul *atenua,* care înseamnă „a reduce în intensitate, a slăbi, a înmuia". După mulți ani de muncă, acest grup de cercetători a descoperit că, după inițierea transcripției operonului trp , sinteza ARNm poate fi terminată într - un punct aflat la aproximativ 140 de nucleotide în amonte de transcript, înainte de a întâlni șablonul de ADN care conține genele structurale. Această moleculă de ARN din amonte se numește *secvența lider 5′* . Evident, în absența triptofanului, această atenuare este cumva compensată, permițând transcripția întregului operon.

Identificarea situsului de atenuare a fost posibilă prin izolarea mai multor mutații de deleție într-o regiune de 25 de nucleotide între nucleotidele 115 și 140 ale secvenței lider. Aceste mutații suprimă atenuarea. Acest situs este cunoscut sub numele de *atenuator.* Figura 16.13 rezumă explicația propusă de Yanofsky și colegii săi despre cum are loc atenuarea și cum este depășită. Operonul și secvența inițială de ADN care este transcrisă sunt prezentate în Figura 16.13(a). Inițial, transcripția generează secvența lider [Figura - 16.13(b)], care are capacitatea de a se plia în două structuri stem-loop care se exudă reciproc, numite *ace de păr.* Dacă este prezent triptofanul, acul de păr care se formează acționează ca un *terminator,* determinând terminarea prematură a transcripției. Invers, dacă triptofanul este limitat, se formează o structură alternativă de tip ac de păr, numită antiterminator . În acest caz, transcripția continuă dincolo de regiunea antiterminatoare , producând ulterior ARNm-ul care reprezintă întregul operon. Aceii de păr prezentați în Figura 16.13(c) sunt exemple de *structuri secundare ale ARN-ului.*

Principala întrebare care rămâne de rezolvat este cum prezența triptofanului duce la atenuare și cum absența triptofanului permite evitarea acesteia. Modelul lui Yanofsky, care constituie o adevărată revelație în studiul reglării genetice, se bazează pe două puncte cheie: (1) ribozomii bacterieni se pot lega de moleculele de ARNm și pot iniția translația înainte ca *transcripția* unei gene (sau operon *)* să fie finalizată *(vezi* Figura 13.15); și (2) regiunea lider a ARNm include mai mulți codoni de triptofan . Yanofsky a propus că, dacă codonii de triptofan sunt *traduși ,* se formează acul de păr de terminare . Cu toate acestea, atunci când triptofanul este rar sau absent în celulă, ceea ce este disponibil este ARNt ^{Trp} · Încărcarea inadecvată face ca traducerea să se blocheze la codonii triptofanului . Această blocare a translației determină formarea acului *de păr anti-terminator* , permițând *transcrierii* să continue pe întreaga lungime a operonului.

Modelul precedent reprezintă o abordare originală a reglării - genelor , pe care am putea-o numi *reglare translațională a transcripției* . *Pe* scurt , disponibilitatea ARNt-urilor ^{T,p} , a căror formare depinde de nivelurile de triptofan, este esențială pentru acest mecanism , care ajustează fin reglarea operonului . Acest model este susținut experimental de mai multe studii genetice în care diverse regiuni ale secvenței lider reprezentând tulpini - reglatoare au fost mutate sau șterse . În toate cazurile, predicțiile privind aceste modificări genetice s-au îndeplinit.

Întrucât reglarea atenuării depinde de apariția simultană a traducerii și transcripției , o legătură imposibilă la eucariote, acest proces este limitat la organismele procariote . A fost detectat și în alți operoni bacterieni din E. coli, inclusiv în cei responsabili de biosinteza aminoacizilor precum treonina, histidina , leucina și fenilalanina . Ca și în cazul operonului trp , Atenuatorii acestor operoni conțin mai mulți codoni care declanșează reglarea aminoacizilor. Când aminoacidul relevant nu este disponibil, traducerea este „blocată", permițând continuarea transcripției. De exemplu, secvența lider a operonului histidină codifică șapte reziduuri de histidină contigue .

Proteinele TRAP și AT determină atenuarea în *B. subtilis*

Este important să ne amintim că nu toate organismele, nici măcar cele de același tip, rezolvă probleme precum reglarea genelor exact în același mod. Prin urmare, nu este neobișnuit ca geneticienii să descopere că au apărut noi strategii în *timpul* evoluției . Adesea , noua metodă este o variație a aceleiași teme . Acesta este cazul reglării operonului trp la diferite bacterii .

(a) Transcripția operonului *trp* (ADN)

tmE regiune lider *trpD trpC trpB trpA*

— _____ :I 11 I = ADN

Transcriere

: secvență lider *irp* ARNm AUG UCGUGG

i *A* UUUUUU

(codonii [12] **3** **4**
triptofan)

(b) Structuri de tip buclă-tulpină în secvența ARN lider (c) Structuri secundare alternative ale ARN lider

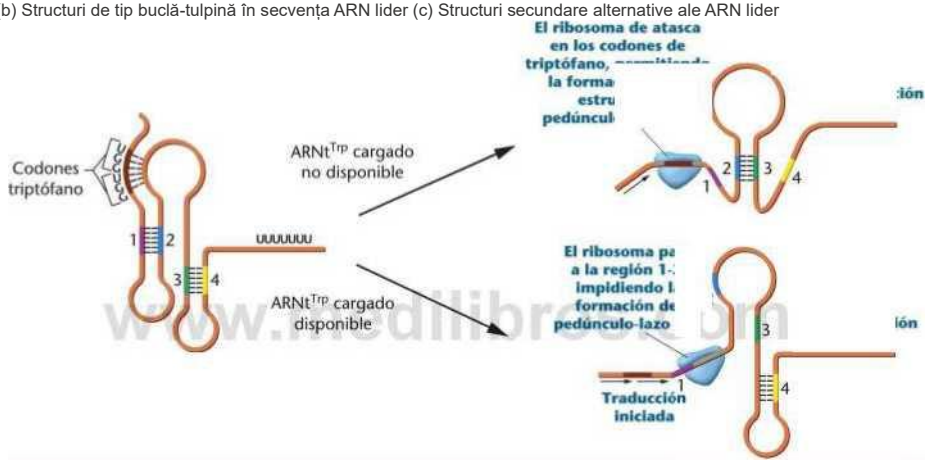


FIGURA 1 Atenuarea operonului triptofan. (a) Transcripția *operonului trp,* care prezintă regiunea lider urmată de cele cinci *gene trp.* Regiunea lider a ARNm este mărită pentru a arăta codonul de începere a translației (AUG), cei doi codoni de triptofan (UGGUGG) *și* lanțul rezidual U de la capătul lider . Cele patru regiuni etichetate cu 1 , 2, 3 și 4 indică locația a patru secvențe care au potențialul de a forma tulpini prin împerecherea bazelor . (b) Două posibile structuri de tip tulpină-buclă care se pot forma în ARNm-ul secvenței lider. (c) Două structuri secundare alternative care se pot forma în secvența ARNm lider în timpul translației ARNm, în funcție de disponibilitatea triptofanului. Prima (în partea de sus) apare în absența triptofanului *și,* prin urmare, în absența ARNt-ului încărcat corespunzător. Prin urmare, se formează o structură de tip buclă-tulpină care implică regiunile *2 și 3.* În timpul traducerii, ribozomul se blochează pe codonii trp în amonte de regiunea 1 , formând o structură anti-terminator . Ca urmare, transcripția de către ARN polimerază continuă . În aval, în prezența triptofanului *și,* prin urmare , a ARNt-ului încărcat corespunzător , ribozomul continuă traducerea, depășind regiunea 1 și codonii triptofanului, ceea ce inhibă formarea structurii de tip buclă - tulpină anti-terminator a regiunilor 2-3. Ca urmare, semnalul anti - terminator este întrerupt și transcripția se termină. Acest proces se numește atenuare.

După cum am văzut anterior, *E. coli,* o bacterie Gram-negativă, folosește ARNt ^{Lrp} și o secvență de păr terminală în secvența lider ca mecanism de atenuare a transcripției *operonului său trp.* Bacteria Gram-pozitivă *Bacillus subtilii* folosește, de asemenea, atenuarea și ace de păr pentru a-și regla *operonul trp.* De fapt, E. *subtilii* se bazează pe atenuare ca unic mecanism de reglare, deoarece acestei bacterii îi lipsește un mecanism care să reprime complet transcripția în acest operon, spre deosebire de E. *coli.*

Totuși, semnalele moleculare care provoacă atenuare la B. *subtilis* nu utilizează un proces de translație și oprire , așa cum *face E. coli.* pentru a induce formarea unei furci care termină transcripția.

În schimb, are o proteină, izolată în 1990 de Charles Yanofsky și colaboratorii săi, care se poate lega sau nu de secvența lider atenuator, inducând astfel configurațiile alternative terminator și respectiv anti-terminator.

Modul în care *B. subtilis* realizează atenuarea este unic. Proteina, numită proteină *de atenuare a legăturii ARN trp* (TRAP *),* se leagă de triptofan dacă acesta este prezent în celulă . TRAP este compusă din 11 subunități care formează o structură proteică cuaternară simetrică. Fiecare subunitate se poate lega de o moleculă de triptofan , încorporând-o într-o cavitate profundă din interiorul proteinei [Figura 16.14 (a)]. Când este complet saturată cu triptofan, această proteină se poate lega de secvența lider 5' a transcriptului ARN, care conține 11 triplete repetitive de GAG sau UAG, separate prin mai multe nucleotide spacer. Fiecare triplet se leagă de una dintre subunități, care conține o cavitate de legare pentru triplet. La legarea la transcript, TRAP este înconjurat de...

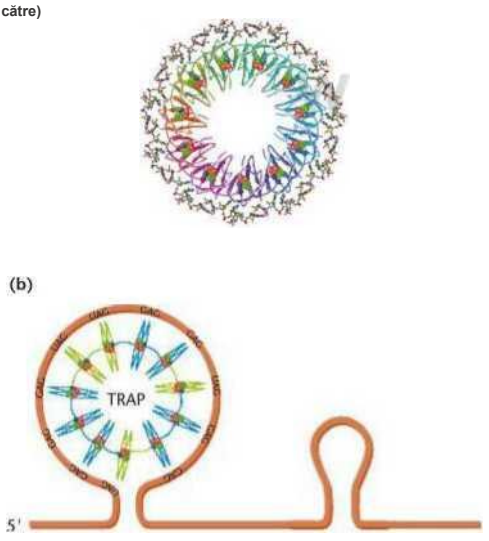


FIGURA 16.14 (a) Model al proteinei atenuatoare de legare a ARN-ului *trp* (TRAP). Această moleculă simetrică este alcătuită din 11 subunități, fiecare dintre acestea putând lega o moleculă de triptofan, care este conținută în subunitate.
(b) Interacțiunea unei molecule TRAP legate de triptofan cu secvența lider a operonului *trp* din 8. *subtilis.* Această interacțiune induce formarea furcii de terminare, atenuând expresia operonului trp . *O* centură de legare a ARN-ului [Figura 16.14(b)] și formarea acesteia previn formarea furcii anti-terminale . În schimb , rezultatul final este configurația terminatorului, ceea ce duce la terminarea prematură a transcripției și, în consecință , la atenuarea expresiei operonului .

Strategia de atenuare a lui *B. subtilis* implică un mecanism de reglare interesant. Există două observații care le-au sugerat lui Yanofsky și colaboratorilor săi că strategia de atenuare a *lui B. subtilis Ar* putea fi chiar mai complex decât se credea inițial. În primul rând , reglarea operonului *trp* al genei B. *subtilis* este extrem de sensibilă la o gamă largă de concentrații de triptofan . Această ajustare fină sugerează că ar putea fi la lucru altceva decât simplul mecanism pornit-oprit atribuit TRAP . În al doilea rând , o mutație a genei care codifică triptofanil -ARNt sintetaza duce la supraexprimarea operonului trp . chiar și în prezența unui exces de triptofan. Această enzimă este responsabilă de încărcarea ARNt ^{Trp} ; în absența sa , se acumulează molecule de ARNt ^{Irp} . neîncărcat și reglarea este perturbată. Perturbarea reglării ar sugera că ^{ARN} -urile ^{Ir} ARN-urile neîncărcate joacă un rol important în atenuare , ceea ce i-a determinat pe Yanofsky și colaboratoarea sa, Angela Vaibuzzi, ^{să} se întrebe cum funcționează ARN-ul ^{Tr} Ar putea fi implicat în TRAP. Ceea ce au descoperit ne extinde cunoștințele despre acest sistem de reglare.

Acești cercetători au descoperit că există o altă proteină , anti-TRAP (AT), care furnizează un semnal metabolic că ARNt -ul ^{T,p} Este neîncărcat, ceea ce indică faptul că triptofanul este foarte rar în celulă. Yanofsky și Vaibuzzi au emis teoretizarea că ARNt neîncărcat r'p induce ^{un} operon separat pentru a exprima gena AT . Proteina AT se asociază apoi cu TRAP, în special atunci când se află în starea activată de triptofan , și inhibă legarea TRAP $^{la\ secvența}$ sa țintă, care este cea a ARN- ului lider .

nu numai că adaugă o altă dimensiune înțelegerii noastre asupra acestui sistem de reglare genică , dar explică și observația inițială conform căreia o mutație în gena ARNt a sintazei Tr1 ' duce la supraexprimarea operonului trp . Mutația previne încărcarea ARNt ^{Irp} , chiar și în prezența triptofanului. Pe măsură ce se acumulează ARNt neîncărcat · acesta induce proteina AT , care se leagă de TRAP . Acest lucru împiedică legarea TRAP de secvența de ARN lider ; ca urmare · operonul trp este supraindus .

Descrierea de mai sus demonstrează complexitatea mecanismelor de reglare la bacterii. O astfel de strategie complexă, rezultatul unui proces evolutiv , mărturisește importanța deosebită a reglării atente a expresiei genelor la bacterii.

ACUM REZOLVĂ ASTA

16.3 Luați în considerare reglarea operonului *trp* în *B. subtilis*. Pentru fiecare dintre următoarele cazuri, indicați dacă genele structurale ale operonului sunt exprimate sau nu:

- **(a) TRAP prezent, ARNt $^{Trp\ abundent}$, triptofan abundent.**
- **(b) TRAP prezent, ARNt ^{T,p} abundent, triptofanul este cazul.**
- **(c) TRAP prezent, ARNt ^{Trp} rar, triptofan abundent .**
- **(d) TRAP absent, ARNt $^{T,p\ abundent,\ triptofan\ abundent.}$**

De asemenea, indicați în fiecare caz dacă este prezent AT. Descrieți funcția TRAP și AT în atenuare.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă se referă la reglarea operonului trp al B. subtilis, în care este implicată proteina TRAP; problema necesită înțelegerea conceptului situației. Ni se cere să prezicem dacă genele structurale vor fi sau nu exprimate în diverse circumstanțe. Cheia rezolvării problemei este de a realiza că, spre deosebire de E. coli, care folosește triptofanul ca represor împreună cu procesul de atenuare pentru a regla operonul trp, B. subtilis folosește doar procesul de atenuare și proteina TRAP pentru a regla acest operon.*

16,7

Ribo-comutatorii folosesc ARN care detectează metaboliții pentru a regla expresia genelor

a fost determinat mecanismul de atenuare în operonul trp, au fost documentate numeroase cazuri de reglare genică care depind și de forme alternative de structuri secundare ale ARNm. Aceste cazuri implică ceea ce se numesc riboswitch-uri , care sunt secvențe (sau elemente) de ARNm prezente în regiunea 5' netradusă (5'-UTR) în amonte de secvențele codificatoare. Aceste elemente sunt capabile să se lege de liganzi moleculari mici, cum ar fi metaboliții, a căror sinteză sau activitate este controlată de genele codificate de ARNm. Această legare provoacă o modificare conformațională într-un domeniu al elementului riboswitch, care induce o altă modificare într-un al doilea domeniu ARN, creând în general o *structură terminatoare.* Această regiune terminatoare interacționează direct cu mecanismul de transcripție și îl dezactivează. Prin urmare, ARNm este capabil să răspundă la mediul celulei și să-și regleze propria expresie. O caracteristică comună a tuturor riboswitch-urilor este prezența unei secvențe de *ARN care detectează metaboliții* și care poate adopta una dintre cele două structuri secundare posibile, permițând transcripției acestui ARN să continue sau nu. Decizia depinde de concentrația unei componente moleculare din celulă a cărei existență este influențată de genele codificate de ARN-ul respectiv.

Există multe clase de ribocomutatori, care recunosc o gamă largă de liganzi, inclusiv aminoacizi, purine, cofactori de vitamine, aminozaharuri și ioni metalici, printre altele. Aceștia sunt răspândiți printre bacterii. În *Bacillus subtilis,* de exemplu, aproximativ cinci procente din genele bacteriene sunt reglate de ribocomutatori . Aceștia se găsesc și în archaea, ciuperci și plante și pot fi prezenți și la animale.

Cele două domenii importante dintr-un riboswitch se numesc aptamer, care se leagă de ligand, și platforma de expresie, care este capabilă să formeze structura terminatoare. Figura 16.15 ilustrează principiile pe care se bazează controlul riboswitch-ului. 5' -UTR-ul unui ARNm este prezentat în partea stângă a figurii în absența ligandului (metabolitului). ARN polimeraza a transcris domeniul nelegat al aptamerului și, în conformația *predeterminată* , Domeniul de expresie adoptă o *conformație anti-terminantă.* Prin urmare, transcripția continuă de-a lungul platformei de expresie și a regiunii codificatoare. În partea dreaptă a figurii, care reprezintă cazul care apare în prezența ligandului, ligandul se leagă de domeniul aptamer, inducând o conformație alternativă în aptamer, care la rândul său induce o modificare a domeniului de expresie, creând conformația terminatorului . ARN polimeraza este blocată, iar transcripția încetează.

Deși această descriere se potrivește majorității ribocomutatorilor studiați , există două variante ale acestui model care completează analiza noastră asupra subiectului. În primul rând, este posibil ca poziția implicită a unui ribocomutator să corespundă *conformației terminatorului* . *De* exemplu, să luăm în considerare 5' -UTR-urile care reprezintă gene care codifică aminoacil-ARNt sintetaze, enzimele care încarcă ARNt-urile cu aminoacizii lor înrudiți *(vezi* Capitolul 14). În aceste cazuri, ARNt-urile descărcate servesc drept liganzi și se leagă de aptamerul 5'-UTR, inducând conformația *anti-terminator* . Aceasta permite transcripția genelor, ducând la traducerea ulterioară a enzimelor necesare pentru încărcarea ARNt-urilor. Atunci când ARNt-urile încărcate sunt abundente și ARNt-urile neîncărcate nu sunt prezente pentru a se lega de aptamer, ribocomutatorul, în condițiile predeterminate , adoptă *conformația terminatorului,* dezactivând efectiv transcripția. Așa cum s-ar putea prezice, ARNt-urile încărcate sunt foarte capabile să se lege de aptamer.

În cele din urmă, există exemple de ribocomutatori bacterieni în care , ca în cazul atenuării operonului *trp* discutat mai sus, -conformațiile alternative 5'-UTR permit finalizarea transcripției, dar legarea ligandului la aptamer induce o

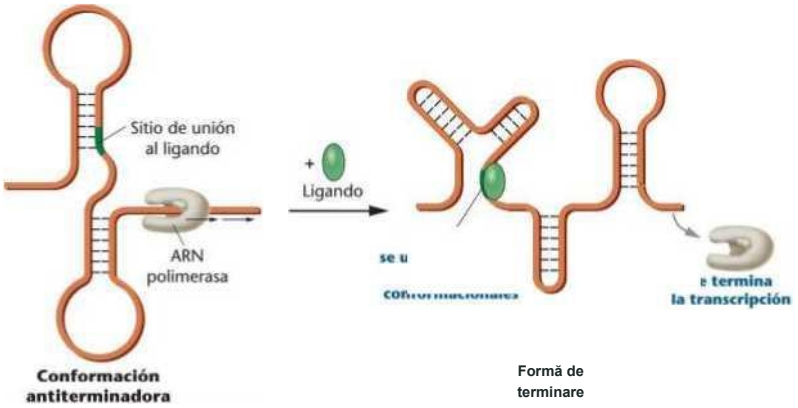


FIGURA 16.15 Ilustrarea mecanismului de reglare a expresiei genelor prin intermediul unui ribo-comutator, unde poziția predeterminată (stânga) corespunde conformației anti-terminale și, după legarea cu ligandul, se adoptă conformația terminală.

o conformație care inhibă traducerea prin ribozomi . În astfel de cazuri, reglarea expresiei genelor are loc la nivelul traducerii .

16,8

Operonul ara este controlat de o proteină reglatoare care exercită atât control pozitiv, cât și negativ.

Vom încheia acest capitol cu o scurtă discuție despre operonul arabinoză (ara), așa cum a fost studiat la *E. coli.* Acest operon inductibil este special deoarece aceeași proteină reglatoare este capabilă să exercite atât control pozitiv, cât și negativ și, în consecință, poate atât induce, cât și reprima expresia genelor. Figura 16.16(a) prezintă componentele operonului , iar figurile 16.16(b) și (c) prezintă, respectiv, condițiile în care operonul este activ sau inactiv.

1. Metabolismul arabinozei zaharide este dirijat de produșii enzimatici a trei gene structurale, *araB, A și D* [Figura 16.16(a)]. Transcripția sa este controlată de proteina reglatoare AraC, codificată de gena araC , care *interacționează* cu două regiuni reglatoare , arai *și* araO2 . *Aceste* ‡‡‡‡‡situsuri se pot lega individual sau într-o manieră coordonată de proteina AraC.
2. Regiunea *I* este denumită astfel deoarece atunci când AraC se leagă singur de aceasta, sistemul este indus [Figura 16.16(b)]. Pentru ca acest lucru să se întâmple, trebuie să fie prezente atât arabinoza, cât și cAMP. Astfel, la fel ca în inducerea operonului *lac, există un* situs de legare CAP în regiunea promotorului , care modulează represia catabolitului în prezența glucozei.
3. În absența atât a arabinozei, cât și a AMPc, proteina AraC se leagă într-o manieră coordonată de situsul 1 și de situsul O (denumit astfel deoarece este a doua regiune a operatorului descoperită în acest operon). Când atât *I* , cât și O2 Când sunt legate de AraC, ADN-ul suferă o modificare conformațională , formând o buclă strânsă [Figura 16.16(c)], iar genele structurale sunt reprimate.
4. Regiunea O_2 este situată la aproximativ 200 de nucleotide în amonte de regiunea *I.* Legarea la oricare dintre aceste regiuni reglatoare implică un dimer AraC. Când AraC se leagă de ambele regiuni, dimerii interacționează, generând bucla care provoacă represia . Această buclă inhibă probabil accesul ARN polimerazei la regiunea promotorului. Regiunea ADN situată între *I și* O_2, Regiunea care formează

‡‡‡‡‡Există și o altă regiune operator (O_1), dar aceasta nu este implicată în reglarea genelor structurale *ara.*

bucla este vitală pentru formarea complexului de represie . Alterarea genetică a acestei regiuni prin inserarea sau ștergerea câtorva nucleotide este suficientă pentru a interfera cu formarea buclei și, prin urmare, cu represia.

Aceste descoperiri asupra operonului *ara* Acestea servesc la - ilustrarea gradului de complexitate existent în reglementarea

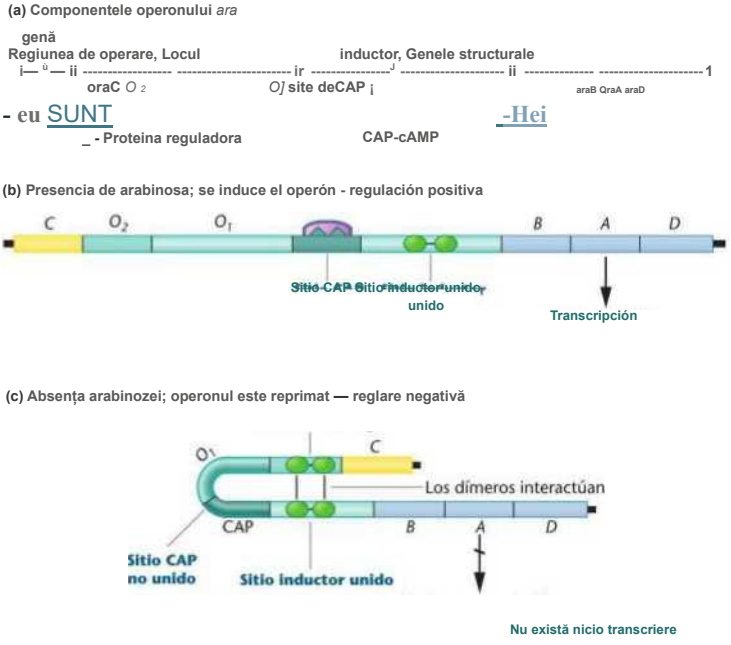


FIGURA 16.16 Reglarea genetică a *operonului ara*. Proteina reglatoare a genei *araC* **acționează** atât ca inductor (în prezența arabinoză) ca represor (în absența arabinozei).

un grup de gene înrudite. Așa cum s-a menționat la începutul acestui capitol, dezvoltarea mecanismelor de reglare a oferit avantaje evolutive sistemelor bacteriene, permițându-le să se adapteze la diverse medii naturale. Aceste sisteme sunt, fără îndoială, bine pregătite genetic nu numai pentru a supraviețui în condiții fiziologice schimbătoare, ci și pentru a face acest lucru cu o eficiență biochimică ridicată.

ŞI STUDIU DE CAZ | Toxiinfecție alimentară și expresie genică bacteriană

La o universitate din Statele Unite, mai mulți studenți se prezintă la serviciul medical cu febră, dureri musculare și vărsături. Testele alimentare arată că au o toxiinfecție alimentară de origine bacteriană , cauzată de Listeria *monocytogenes.* **Un student la biologie întreabă cum este posibil ca bacteria să treacă din intestin în fluxul sanguin. Doctorul explică faptul că celulele** *Listeria* **care exprimă o proteină de suprafață celulară , Ini A, sunt capabile să utilizeze receptorii de pe suprafața celulelor intestinale pentru a intra în ele și a difuza de acolo în sânge . Odată ajunse în sânge, bacteriile ajung în ficat, unde folosesc o altă proteină de suprafață celulară , InlB, pentru a pătrunde în celulele hepatice, care sunt principalele locuri de infecție. De asemenea, el explică faptul că nivelurile transcripționale ale genelor** *inlA...* **e** *inlB* **determină potențialul infecțios al diferitelor tulpini de** *Listeria.*

Mai târziu, studentul discută incidentul cu profesorul său de genetică și împreună iau în considerare mai multe întrebări despre modul în care bacteriile sunt capabile să deturneze funcțiile normale ale receptorilor celulelor umane ca parte a ciclului lor de viață .

1. **Cum putem determina dacă genele** *inlA* **Sunt proteinele** *inlB* **exprimate constitutiv sau induse în prezența receptorilor umani ?**
2. **Ar putea aceste gene să fie exprimate în mod normal la niveluri scăzute, dar să experimenteze o creștere a transcripției odată ce intră în contact cu celulele epiteliale intestinale ? Cum s-ar putea determina acest lucru ?**
3. **Genele** *inlA* **și** *inlB* **fac parte dintr-un operon sau au un promotor comun ? Ce experimente ne-ar permite să testăm această întrebare?**
4. **fi utilizată înțelegerea mecanismului de reglare a acestor gene bacteriene pentru a trata infecțiile?**

Sentimentul de colectivitate: rețele sociale în lumea bacteriilor

D. Timp de decenii, oamenii de știință au considerat bacteriile ca organisme independente , unicelulare, incapabile de comunicare între celule. Cu toate acestea, cercetări recente au arătat că multe bacterii pot regla expresia genelor și pot coordona comportamentul grupului printr-un tip de comunicare numită *detectare a cvorumului* . Prin acest proces, bacteriile trimit *și* primesc semnale chimice numite autoinductori care transmit informații despre dimensiunea populației. Când dimensiunea populației atinge colectivul necesar sau „cvorumul" - un termen care, în termeni economici, se referă la numărul minim de membri ai unei organizații care trebuie să fie prezenți pentru a desfășura activități - autoinductorii reglează expresia genelor într-un mod care aduce beneficii grupului în ansamblu. Fenomenul de detectare a cvorumului a fost descris la peste 70 de specii de bacterii, iar aplicațiile sale variază de la controlul bioluminescenței în bacteriile marine până la reglarea expresiei factorilor toxici virulenți în bacteriile patogene. Cunoașterea simțului colectivității ne-a schimbat percepția asupra reglării genelor procariote și duce la dezvoltarea de aplicații practice, inclusiv la noi antibiotice.

Domeniul fenomenului de colectivitate a fost descoperit în 1960, în timpul cercetărilor asupra bioluminescenței bacteriei *Vibrio fischeri,* care trăiește într-o relație simbiotică cu calmarul *Euprymna scolopes.* Când calmarul se hrănește noaptea, folosește lumina emisă de *V. fischeri* din organul său bioluminescent pentru a ilumina fundul oceanului, contracarând umbrele aruncate de lumina lunii , care în mod normal acționează ca un far pentru prădătorii calmarului . Această relație simbiotică oferă bacteriilor un mediu protejat și bogat în nutrienți în cadrul organului bioluminescent al calmarului. În timpul zilei, bacteriile nu emit lumină, ca urmare a capacității calmarului de a reduce concentrația de bacterii din organul său bioluminescent, ceea ce, la rândul său, previne exprimarea operonului luciferazei bacteriene *(lux).*

Ce leagă genele de luminescență *(lux) ?* a acestor bacterii ca răspuns la densitatea celulară mare și le dezactivează ca răspuns la densitatea celulară scăzută ? La *V. fischeri,* Autoinductorul responsabil este o moleculă de homoserină lactonă secretată de bacterii . La o anumită dimensiune critică a populației , aceste molecule se acumulează, sunt absorbite de bacteriile care alcătuiesc populația și reglează operonul *lux.* legare - directă la factorii de transcripție care stimulează expresia genică a lux .

De la descoperirea simțului de - colectivitate la *Vibrio fischeri,* Oamenii de știință au identificat sisteme similare de comunicare microbiană și la alte bacterii, inclusiv la agenți patogeni umani importanți , cum ar fi Pseudomonas, Staphylococcus și Streptococcus . Expresia a până la 15 % din genele bacteriene poate fi reglată de simțul colectivității.

Moleculele utilizate pentru sentimentul de colectivitate pot media, de asemenea, comunicarea între membrii diferitelor specii . În 1994 , Bonnie Bassler și colegii săi de la Universitatea Princeton au descoperit că o moleculă autoinductoare din bacteria marină *Vibrio harveyi* era prezentă și în multe alte tipuri de bacterii. Această moleculă , autoinductor 2 (AI-2), are potențialul de a media „conversații de colectivitate " între specii și, astfel, de a servi drept limbaj universal pentru comunicarea bacteriană. Întrucât acumularea de AI-2 este proporțională cu numărul de celule și având în vedere că structura sa poate varia ușor între diferite specii , ipoteza actuală este că AI -2 poate transmite informații despre densitatea celulară și compoziția speciilor în cadrul unei comunități bacteriene .

Bacteriile patogene folosesc fenomenul de colectivitate pentru a regla expresia genelor , ale cărei produse ajută aceste bacterii să invadeze o gazdă și să evite detectarea de către sistemul imunitar. De exemplu, *Vibrio cholerae,* agentul care provoacă holera , folosește AI-2 și un autoinductor suplimentar specific speciei pentru a activa genele care controlează producția de toxină holeră . *Pseudomonas aeruginosa ,* o bacterie Gram - negativă care afectează adesea pacienții cu - fibroză chistică, folosește colectivitatea pentru a regla producția de elastază, o protează care deteriorează epiteliul respirator și interferează cu funcția ciliară . *P. aeruginosa* folosește, de asemenea, autoinductori pentru a controla producția de biofilme, un strat protector dur care rezistă apărării gazdei și face tratamentul cu antibiotice aproape imposibil. Alte bacterii determină densitatea celulară printr-un sentiment de colectivitate pentru a întârzia producția de substanțe toxice până când colonia este suficient de mare pentru a copleși sistemul imunitar al gazdei și a stabili o infecție. Deoarece multe bacterii folosesc acest sentiment de colectivitate pentru a regla genele care cauzează boli , terapiile care blochează acest sentiment de colectivitate pot ajuta la

combaterea infecțiilor. Cercetările privind aceste potențiale terapii sunt în curs de desfășurare, iar mai multe se apropie de stadiul de studii clinice. Astfel, ceea ce a început ca o observație fascinantă la calmarul bioluminescent a deschis o eră interesantă de cercetare în domeniul geneticii bacteriene, care ar putea avea într-o zi implicații clinice majore.

Rândul tău

Ia- vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Investigați referințele și linkurile furnizate pentru a încerca să înțelegeți mecanismele și potențialele aplicații ale simțului de colectivitate la bacterii.

1. Moleculele care inhibă simțul colectivității prezintă un mare potențial ca agenți antibacterieni . Ați putea enumera câteva modalități prin care inhibitorii simțului colectivității ar putea fi utilizați pentru combaterea infecțiilor bacteriene ? A ajuns vreuna dintre aceste tehnici terapeutice în faza de studiu clinic ?

Puteți găsi o analiză recentă a terapiilor bazate pe sentimentul de colectivitate în Njoroge, J. și Sperandio, V. 2009. Bruierea comunicării bacteriene : Noi abordări pentru tratamentul bolilor infecțioase. *EMBO Mol. Med.* 1(4): 201-210.

2. Reglarea expresiei genelor bacteriene de către moleculele autoinductoare implică mai multe mecanisme diferite . Descrieți aceste mecanisme și modul în care fiecare ar putea fi utilizat ca țintă pentru controlul infecțiilor bacteriene.

Mecanismele prin care autoinductorii reglează expresia genelor sunt rezumate în Asad, S. și Opal,
S.M. 2008. Analiză de la laborator la patul pacientului: Detectarea cvorumului și rolul comunicării intercelulă în timpul infecției bacteriene invazive . *Critical Care* 12: 236-247.

3. Sistemele de simț colectiv sunt , de asemenea, capabile să detecteze și să răspundă la semnalele chimice emise de celulele gazdă . Explicați cum funcționează acest lucru și cum pot - beneficia bacteriile patogene de pe urma acestuia.

Un articol de sinteză care analizează această comunicare între regnurile animale în raport cu sentimentul de colectivitate poate fi găsit în Wagner, VE și colab. 2006. *Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals*. *Trends Microbiol.* 14(2): 55-58.

Puntos de resumen

1. Cercetări asupra operonului *lac* din ***E. coli*** Ne -au deschis ușa pentru a înțelege mecanismele de reglare genică la bacterii.
2. Genele implicate în metabolismul lactozei sunt reglate într-un mod coordonat de un sistem de control negativ care răspunde la prezența sau absența lactozei.
3. Proteina activată de catabolit (CAP) exercită un control pozitiv asupra expresiei genei lac prin *interacțiunea* cu ARN polimeraza la promotorul *lac* și prin răspunsul la nivelurile de AMP ciclic din celula bacteriană.
4. Represorul *lac* din *E. coli* a fost izolat și studiat. Analiza structurii sale cristaline arată cum interacționează cu ADN-ul operonului , precum și cu inductorii, dezvăluind modificări conformaționale ale ADN-ului care duc la formarea unei bucle de represie , care inhibă legarea dintre ARN polimeraza și regiunea promotorului operonului .

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

5. Spre deosebire de operonul *lac inductibil,* operonul *trp* Este reprimat . În prezența triptofanului, represorul se leagă de regiunea reglatoare a operonului *trp* și reprimă inițierea transcripției .
6. Procesul de atenuare , care reglează operonii pe baza prezenței unui anumit produs final, implică modificări ale structurii secundare a ARNm, ducând la terminarea prematură a transcripției.
7. Ribo-comutatorii reglează expresia genelor prin modificări conformaționale în structura secundară a regiunii lider 5'-UTR a ARNm-urilor.
8. Operonul *ara* La *E. coli* este special, deoarece aceeași proteină reglatoare exercită atât control pozitiv, cât și negativ asupra expresiei genelor care codifică enzimele ce metabolizează arabinoza.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Un operon ipotetic *(theo)* al *E. coli* conține mai multe gene structurale care codifică enzime implicate secvențial în biosinteza unui aminoacid. Spre deosebire de *operonul lac,* în care gena represoare este separată de operon , gena care codifică molecula reglatoare se află în *operonul theo.* Când produsul final (aminoacidul) este prezent , acesta se combină cu molecula reglatoare , iar acest complex se leagă de operator, reprimând operonul. În absența aminoacidului , molecula reglatoare nu se leagă de operator și are loc

transcripția .

Clasificați și caracterizați acest operon, apoi luați în considerare - următoarele mutații, precum și situația în care gena de tip sălbatic este prezentă împreună cu gena mutantă în celule parțial diploide (F'):

(a) Mutație în regiunea operatorului.
(b) Mutație în regiunea promotorului.
(c) Mutație în gena reglatoare.

În fiecare dintre aceste cazuri, operonul va fi transcris sau nu, presupunând că mutația afectează reglarea operonului *theo?* Comparați fiecare răspuns cu situația echivalentă a operonului *lac* .

Soluție. Operonul *teo* este represibil și se află sub control negativ. Când nu există aminoacid în mediu (sau înconjurător), produsul genei reglatoare nu se poate lega de regiunea operatorului, iar transcripția continuă sub conducerea ARN polimerazei. Enzimele necesare pentru sinteza aminoacizilor sunt produse, la fel și molecula reglatoare. Dacă aminoacidul este prezent în mediu, fie de la început, fie după ce a avut loc o sinteză suficientă, aminoacidul se leagă de regulator, formând un complex care interacționează cu regiunea operatorului, provocând represia transcripției genelor operonului.

Operonul *theo* este similar cu sistemul triptofan, cu excepția faptului că gena reglatoare este localizată în operon, nu separată. Prin urmare, în *operonul theo,* gena reglatoare este reglată de prezența sau absența aminoacidului.

(a) Ca și în *operonul lac,* o mutație a operatorului *theo* inhibă legarea la complexul represor, iar transcripția are loc constitutiv. Prezența unei plasmide F' care conține alela de tip sălbatic nu va avea niciun efect, deoarece nu este adiacentă genelor structurale.
(b) regiunea promotorului *theo* ar inhiba, fără îndoială, legarea ARN polimerazei și, prin urmare, transcripția. Acest lucru s-ar întâmpla și în *operonul lac.* O alelă de tip sălbatic localizată pe plasmida F' nu ar avea niciun efect.
(c) O mutație în *gena regulatorului theo,* ca în sistemul lac , *ar putea* inhiba legarea produsului său fie la gena corepresor, fie la gena operator. În ambele cazuri, transcripția va fi constitutivă deoarece sistemul theo este *represibil* . Ambele cazuri duc la eșecul regulatorului de a se lega de operator, permițând continuarea transcripției . În sistemul *lac* , lipsa legării corepresorului lactozei va reprima permanent sistemul. Adăugarea unei alele de tip sălbatic ar restabili represia, cu condiția ca această genă să fie transcrisă constitutiv.

Problemas y preguntas para la discusión

În acest capitol, ne-am concentrat asupra reglării expresiei genelor la procariote. Pe parcurs, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne -au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol , ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale ?

(a) De unde știm că bacteriile reglează expresia anumitor gene ca răspuns la mediul înconjurător?
(b) Ce test a stabilit că lactoza servește ca inductor al unei gene al cărei produs este legat de metabolismul lactozei ?
(c) Ce i-a determinat pe cercetători să concluzioneze că o moleculă - represoare reglează operonul tac ?
(d) De unde știm că represorul tac este o proteină?
(e) De unde știm că *operonul* trp este un sistem de control represibil, spre deosebire de operonul tac , care este un sistem de control inductibil ?

Comparați necesarul de enzime implicate în metabolismul lactozei și triptofanului la bacterii (a) în prezența și (b) în absența lactozei și respectiv a triptofanului . Comparați sistemele de control pozitiv și negativ.

Comparați funcția represorului într-un sistem inductibil și într-un sistem represibil.

2. genotipurile operonului *lac* prezentate în tabelul de mai jos, preziceți dacă structura genei](Z) este constitutivă, reprimată permanent sau indusă în prezența lactozei.

3.

4. **Zjí.-** *Pentru a vedea problemele și muritorii atribuiți de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com*

5.

Genotip	Inducibil	Constitutiv	Reprimat
/ O c Z 4 /F'O' / + O C			
Z + /F'O' l'CZ*			
*1*0* Z* /FT			

6. se vor produce enzime funcționale, enzime nefuncționale sau nicio enzimă.

Condiția genotipului		Se produce o enzimă funcțională	Se produce o enzimă nefuncțională	Nu se produce nicio enzimă
rO^Z 4	Fără lactoză			X
/ O C Z	Cu lactoză			
28 g ~	Fără lactoză			
r O'Z~	Cu lactoză			
I~O + Z /F'O +*	Fără lactoză /* Q c			
Zf /F'O +	Cu lactoză			

(continuă)

(continuare)

Condiția genotipului		Se produce o enzimă funcțională	Se produce o enzimă nefuncțională	Nu se produce nicio enzimă
COT/ r/ + o + Z	Cu lactoză			
ro + z~/	Fără lactoză			
*I i O + Z'/F'O**	Fără lactoză *fO c*			
Z/*	Cu lactoză			
*F'O*Z**				

7. A fost determinată localizarea numeroaselor mutații *lacI~* și *lacIs* în secvența de *ADN* a genei lacI . Dintre acestea, mutațiile *lacI s-au dovedit a* fi localizate în regiunea 5' în amonte a genei, în timp ce mutațiile *lacI s* sunt localizate în aval. Sunt localizarea acestor două tipuri de mutații în cadrul genei în concordanță cu ceea ce se știe despre funcția represorului, care este produsul *genei lacI?*
8. Descrieți logica experimentală care a permis izolarea *represorului lac.*
9. Ce proprietăți demonstrează că represorul *lac* este o proteină ? Descrieți dovezile că acesta acționează fără îndoială ca un represor în cadrul schemei operonului .
10. Preziceți efectul asupra capacității de inducție a operonului *lac* al unei mutații care perturbă funcția (a) *genei crp,* care codifică proteina CAP, și (b) situsului de legare CAP al promotorului.
11. Eritritolul, un zahăr natural abundent în fructe și alimente fermentate, este cu aproximativ 65% la fel de dulce ca zahărul de masă și are cu aproximativ 95% mai puține calorii. Este mai puțin dăunător pentru dinți și, în general, nu are efecte secundare negative ca produs destinat consumului uman. *Tulpinile* patogene de Brucella care catabolizează eritritolul conțin patru gene apropiate, toate fiind implicate în metabolismul eritritolului. Una dintre cele patru gene *(eryD)* Acesta codifică un produs care reprimă expresia celorlalte trei gene. Catabolismul eritritolului este stimulat chiar de eritritol . Prezentați un model de reglare simplu care explică metabolismul eritritolului la *Brucella.* Credeți că acest sistem este sub control inductibil sau reprimabil ?
12. Descrieți rolul atenuării în reglarea biosintezei triptofanului.
13. Când a fost descoperită atenuarea operonului *trp* În anii 1970 , - atenuarea a fost interpretată ca o modalitate relativ ineficientă de a realiza reglarea genetică a acestui operon. Cu toate acestea, de atunci s -a constatat că este o strategie de reglare relativ comună. Presupunând că atenuarea este o modalitate relativ ineficientă de reglare genetică , ce ar explica utilizarea sa pe scară largă?
14. Neelaredoxina este o proteină de 1-5 kDa , comună la procariotele anaerobe . Are activitate de căutare a superoxidului și este exprimată constitutiv . În plus, dacă este expusă la O_2 sau H_2O, exprimarea sa încetează să mai fie indusă. (Silva, G. , et al. 2001. J. *Bacterial.* 183:4413-20) Ce înseamnă termenii *„exprimare constitutivă"* ? și *inducție* în contextul sintezei doxinei Neelare ?
15. Produsele lactate precum brânza și iaurtul depind de conversia lactozei în glucoză și galactoză de către diverse bacterii anaerobe, cum ar fi mai multe *specii de Lactobacillus* , care produc în cele din urmă acid lactic. Aceste conversii depind de enzimele permază și L -galactozidază ale *operonului lac.* După ce a fost selectată pentru fermentarea rapidă în producția de iaurt , o subspecie de *Lactobacillus și-a pierdut* capacitatea de a regla expresia operonului *lac* (Lapierre, L., et al. 2002. Bacterial . 184:928-35). Ce considerați mai probabil: ca la această subspecie operonul *lac* să fie activat sau dezactivat ? Ce evenimente genetice ar fi putut contribui la această pierdere a reglării?
16. Să presupunem că genele structurale ale operonului *lac* sunt fuzionate, folosind tehnici de ADN recombinant, cu aparatul de reglare al operonului *ara* . Dacă arabinoza este furnizată într- un mediu minimal pentru bacteria *E. coli* Dacă conține această fuziune genetică, credeți că β-galactozidaza ar fi produsă la niveluri induse? Explicați răspunsul .
17. Atât atenuarea operonului *trp* în E. *coli* Cum utilizează ribomutatorii din *B. subtilis* modificările structurii secundare a regiunilor lider ale ARNm pentru a regla expresia genelor. Explicați asemănările și diferențele dintre mecanismele specifice ale acestor două tipuri de reglare.
18. Având în vedere ciclul de viață al bacteriofagului discutat în Capitolul 6, luați în considerare următoarea problemă: În timpul ciclului reproductiv al unui bacteriofag temperat, ADN-ul viral este inserat în cromozomul bacterian, unde profag rezultat se comportă foarte asemănător unui cal troian. Acesta poate rămâne latent sau poate deveni litic și poate inițiа reproducerea urmașilor virali . Mai mulți operoni mențin starea profagului prin interacțiunea cu un represor care previne ciclul litic . Atacurile asupra celulei bacteriene (de exemplu, lumina ultravioletă) duc la ruptura parțială a represorului , care, la rândul său, declanșează producerea de enzime implicate în ciclul litic. Prezentat în această formă simplificată, ați considera că acest sistem de reglare funcționează sub control pozitiv sau negativ?

Problemas extrapicantes

19. Strategiile bacteriene de evitare a diferitelor antibiotice naturale sau produse de om sunt diverse și includ pompe de eflux legate de membrană care elimină antibioticele din celulă. O analiză a acestor pompe (Grkovic, S., et al., 2002) afirmă că, deoarece energia este necesară pentru ca aceste pompe să funcționeze, există un dezavantaj selectiv la activarea lor în absența antibioticului . De asemenea, se afirmă că un anumit antibiotic poate juca un rol de reglare prin interacțiunea atât cu proteinele activatoare, cât și cu cele represoare , în funcție de sistemul particular implicat. Cum ar putea fi clasificate aceste sisteme în termeni de *control negativ (inductibil) ?* sau *represibil)* și de *control pozitiv (inductibil* sau *represibil)?*
20. - un operon ipotetic, genele A, *B, C* și D reprezintă gena represor, secvența promotorului, gena operator și gena structurală , *dar nu neapărat în această ordine.* Acest operon este

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

implicat în metabolismul unei molecule ipotetice (mh). Folosind datele de mai jos, decideți mai întâi dacă operonul este inductibil sau represat. Apoi, atribuiți genele *A, B, C* și *D celor* patru părți ale operonului. Explicați raționamentul. (EA = enzimă activă; SE = enzimă inactivă; SE = fără enzimă).

Genotip	prezent	absent
A'B'C'D'	EA	SE ■
A B'C'D'	EA	EA
*ABC'D^*	SE	SE
ABCD'	El	SE
*A*B*C"D*	EA	EA
ABC~ D ⁺/F'A B~ CD	EA	EA
ABC'D^fF'AB^C'D'	EA	SE
A'B'C D'/F'A'B'CD'	EA + El	SE
AB'C~DiF'AB~C~D~	EA	SE

21. Un operon bacterian este responsabil pentru producerea enzimelor biosintetice necesare pentru producerea ipoteticului aminoacid tisofan (tis). Acest operon este reglat de o genă separată, gena R , a cărei deleție duce la pierderea sintezei enzimelor . În condiții de tip sălbatic, când este prezent tis , enzimele nu sunt produse. În absența tis, enzimele sunt produse . Mutații în genă

AUGAAAGCAAUUJUUCGUACUGAAAGGUUGGUGGCGCACUUGCUGAAACGGGCAGUGUAUUCACCAUGCGUAAAGCAAUCAGAUACCCAGCCCGCCUAAUGAGCGGGCUUtUUUUUB

Operatorul (O-) are ca rezultat represia indiferent de prezența tis. Este acest operon sub control pozitiv sau negativ? Propuneți un model (a) pentru represia genelor în celulele de tip sălbatic în prezența tis și (b) pentru mutații.

22. Se izolează o bacterie marină ce conține un operon inductibil, ale cărei produse genetice metabolizează petrolul atunci când acesta este prezent în mediu. Examinarea arată că operonul este sub control pozitiv și că există o genă *reg* al cărei produs interacționează cu o regiune operator (o) ce reglează genele structurale, numită *sg.*

Pentru a înțelege cum funcționează operonul, au fost izolate și analizate o tulpină mutantă constitutivă și mai multe tulpini diploide parțiale . Rezultatele obținute sunt prezentate mai jos.

Cromozomul gazdă	Factorul F'	Fenotip
Tipul sălbatic	Nu are	inductibil
Tipul sălbatic	gena *reg* a unei tulpini mutante	inductibil
Tipul sălbatic	operonul unei tulpini mutante	constitutiv
Tulpină mutantă	gena *înregistrată* a unei tulpini sălbatice	constitutiv

Trageți toate concluziile posibile din mutație și caracteristicile de reglare ale acestui operon. Mutația este constitutivă în *elementul* reg care acționează în trans sau în elementul sau operatorul care acționează în cis *?*

23 Produsul *genei lexA,* Represorul *LexA reglează negativ genele* de reparare SOS ale E. *coli* (discutate în Capitolul 13). Când o celulă suferă leziuni extinse ale ADN-ului , produsul genei *recA* (RecA) inactivează represorul LexA, iar transcripția genelor SOS crește dramatic.

În cadrul acestei molecule se află secvențele care servesc drept bază pentru formarea structurilor secundare esențiale pentru formarea buclelor alternative în ac de păr, precum și pentru tripleții succesivi care codifică triptofanul, unde are loc oprirea translației. Pe o foaie mare de

Una dintre genele SOS este gena uvrA. Imaginați-vă că sunteți student și investigați funcția produsului genei uvrA în repararea ADN-ului . Izolați o tulpină mutantă care are expresie constitutivă a proteinei UvrA și o denumiți *uvrA.* Mai jos este o diagramă simplificată a operonilor *lexA* și *uvrA:*

pkKA *lexA* *p :.A Q ..rA uvrA*

il- —L -Jl «L — Ju. *0=^*

(a) Descrieți două mutații diferite care au ca rezultat un fenotip de expresie constitutivă a uvrA . Indicați genotipurile reale implicate.

(b) Rezumați o serie de experimente genetice folosind tulpini parțial diploide care vă vor permite să determinați care dintre cele două mutații posibile ați izolat.

24. Un alt coleg de clasă analizează problema abordată în Problema 23 și susține că se poate realiza un experiment mai direct, non-genetic, pentru a diferenția între aceste două tipuri de mutații. Experimentul nu necesită genetică sofisticată și ar permite o analiză ușoară a produselor celorlalte gene SOS . Propuneți ce ar fi acest experiment.

25. Figura 16.13 prezintă câteva regiuni de împerechere a bazelor ARNm care joacă roluri importante în timpul *procesului de atenuare a operonului trp.* Următoarea imagine (pe toată lățimea paginii) prezintă secvența de ribonucleotide care constituie secvența lider, începând de la poziția 30 în aval de capătul 5':

hârtie (cum ar fi hârtia de împachetat Manila) și împreună cu colegii de clasă, analizați această secvență de baze și încercați să identificați codonii *trp* și care părți ale moleculei reprezintă regiunile de împerechere a bazelor care formează buclele terminatoare și antiterminatoare în ac de păr prezentate în Figura 16.13 .

26. Una dintre cele mai răspândite boli cu transmitere sexuală este cauzată de bacteria *Chlamydia trachomatis* și poate duce la orbire dacă nu este tratată . După infecție , celulele metabolic inerte se diferențiază, prin expresia genelor, în celule metabolic active care se divid prin fisiune binară. S- a propus că ieșirea din starea inertă depinde de proteinele de șoc termic care activează ciclul reproductiv și facilitează atașarea Chlamydia la celulele gazdă. Cercetătorii au făcut următoarele observații cu privire la sistemul de reglare a șocului termic la *Chlamydia trachomatis:* (1) O proteină reglatoare (să o numim R) se leagă de un element de ADN cu acțiune *cis* (să o numim D); (2) R și D funcționează ca o pereche represor-operator ; (3) R funcționează ca un regulator negativ al transcripției; (4) D este compus dintr-o secvență repetitivă inversată; (5) Represiunea de către R depinde de superînrăsucirea lui D (Wilson și Tan, 2002).

(a) Pe baza acestor informații, dezvoltați un model care explică reglarea termică a metabolismului la *Chlamydia trachomatis.*

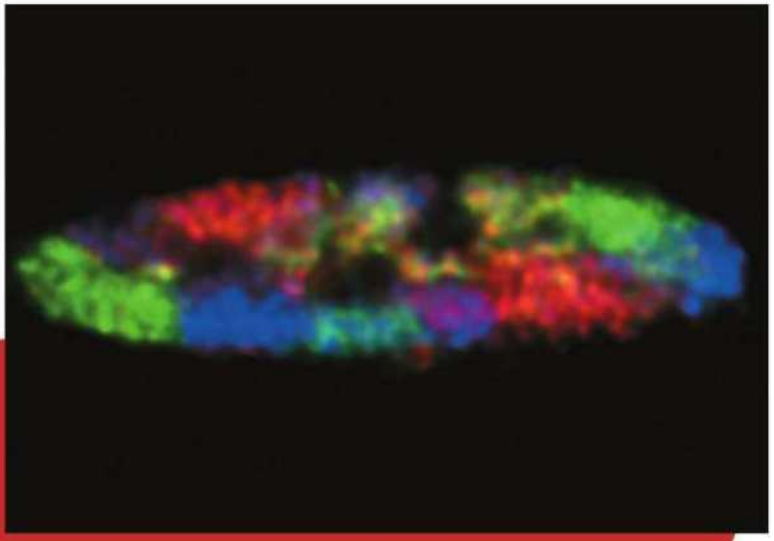
(b) Unele bacterii, cum ar fi *E. coli,* utilizează un factor sigma de șoc termic pentru a regla transcripția șocului termic .

Sunt descoperirile anterioare despre *Chlamydia compatibile* cu utilizarea unui factor sigma sensibil la temperatură ?

27. O genă reporter — adică o genă a cărei activitate este relativ ușor de detectat — este utilizată în mod obișnuit pentru a studia activitatea promotorului în diverse circumstanțe. Tehnologia ADN-ului recombinant este utilizată pentru a uni această genă reporter la promotorul de interes, după care molecula recombinantă este inserată prin transformare sau transfecție în celula sau organismul gazdă ales . Proteina fluorescentă verde (GFP) produsă de meduza *Aequorea victoria* prezintă o fluorescență verde atunci când este expusă la lumină albastră. Să presupunem că am dori să studiem aparatul de reglare al operonului *lac* și am dezvoltat o plasmidă (p) care conține toate elementele operonului lac , cu excepția faptului că am substituit-o cu genele structurale ale *lac* . de către gena *GFP* (gena noastră reporter). Apoi am folosit această plasmidă pentru a transforma *E. coli.* Având în vedere următoarele genotipuri, în care dintre următoarele condiții v-ați aștepta la producerea de β - galactozidază și/sau colonii care erau verzi atunci când erau examinate sub lumină albastră?

Genotip	Condiții de mediu Lactoză, glucoză, tozidază verde	Colonii /J-gaiac-
roz~/piocFP	— 4 + + + -	
l 'O'Z /pl '&GFP	- + + -	
ro'z/procFP	— + + —	
r<an/pro'CFP	— + + -	

Territorios cromosómicos en un núcleo de célula de gallina. Cada cromosoma está teñido con una sonda de color diferente.



17

Reglarea expresiei genelor la eucariote

CONCEPTE CAPITOL

Expresia informației genetice este reglată de mecanisme care exercită control asupra transcripției , procesării ARNm, exportului din nucleu , stabilității ARNm , traducerii și modificărilor post-translaționale.

►► Remodelarea cromatinei , modificările histonei și alterarea ADN-ului joacă un rol important în reglarea expresiei genelor la eucariote .

Rearanjamentele programate ale ADN-ului contribuie la reglarea genelor într-un număr mic de gene.

►► Inițierea transcripției eucariote necesită asamblarea proteinelor reglatoare ale transcripției la situsurile ADN cu acțiune cis, cunoscute sub numele de promotori, amplificatori și amortizori.

►► Activatorii și represorii transcripției stimulează asocierea factorilor generali de transcripție în complexele de pre- inițiere la nivelul promotorilor genelor.

Expresia genelor la organismele eucariote este , de asemenea, reglată de multiple mecanisme post-transcripționale, inclusiv splicing-ul alternativ al pre-ARNm, exportarea din nucleu, controlul stabilității ARNm , reglarea traducerii și procesarea post-translațională .

►► Reducerea la tăcere a genelor indusă de ARN controlează expresia genelor în diverse moduri și este utilizată în cercetarea științifică și în tratamentele medicale .

C. Astfel, toate celulele dintr-un organism eucariot conțin un genom complet; cu toate acestea, în orice tip de celulă dat , este exprimată doar o submulțime a genelor. De exemplu, unele leucocite exprimă gene care codifică anumite imunoglobuline , permițând acestor celule să sintetizeze anticorpi care apără organismul împotriva infecțiilor și a agenților externi. Cu toate acestea, celulele epidermice, renale și hepatice nu exprimă gene ale imunoglobulinelor . Celulele insulare pancreatice sintetizează și secretă insulină ca răspuns la prezența zaharurilor în sânge ; cu toate acestea, nu produc imunoglobuline. În plus, nu sintetizează insulină dacă nu este necesară. Celulele eucariote, ca parte a organismelor multicelulare, nu cresc exclusiv ca răspuns la disponibilitatea nutrienților . Mai degrabă, își reglează creșterea și diviziunea pentru a avea loc în locații adecvate din corp și la momentele potrivite în timpul dezvoltării. Pierderea reglării genelor care controlează creșterea și diviziunea celulară normală poate duce la defecte de dezvoltare sau la apariția cancerului .

Reglarea genelor la organismele eucariote este unul dintre domeniile cu cea mai rapidă creștere ale cercetării genetice . Înțelegerea noastră tot mai amplă a mecanismelor care reglează - expresia genelor la eucariote ne oferă informații fascinante și uneori surprinzătoare. De asemenea, face posibile aplicații practice, cum ar fi potențiale terapii pentru multe boli care afectează oamenii .

În acest capitol, vom explora reglarea expresiei genelor la eucariote. Vom rezuma câteva dintre caracteristicile generale ale reglării genelor, de la rearanjări ale ADN-ului și modificări ale cromatinei până la mecanisme transcripționale și post - transcripționale .

17.1

Reglarea genelor la eucariote poate avea loc în oricare dintre etapele care duc de la ADN la produsele proteice.

La organismele eucariote, expresia genelor este controlată foarte precis pentru a exprima nivelurile necesare de produse genetice la fiecare moment specific, în fiecare tip specific de celulă și ca răspuns la schimbări complexe de mediu. Pentru a atinge acest grad de precizie, eucariotele utilizează un număr mare de mecanisme pentru a modifica expresia genelor. Spre deosebire de reglarea genelor la organismele procariote, care are loc în principal la nivelul inițierii transcripției, reglarea expresiei genelor la eucariote poate avea loc la multe niveluri diferite. Acestea includ modificări ale șablonului ADN, inițierea transcripției, stabilitatea și modificările ARNm și sinteza, modificarea și stabilitatea produselor proteice (Figura 17.1). Diverse caracteristici ale celulelor eucariote

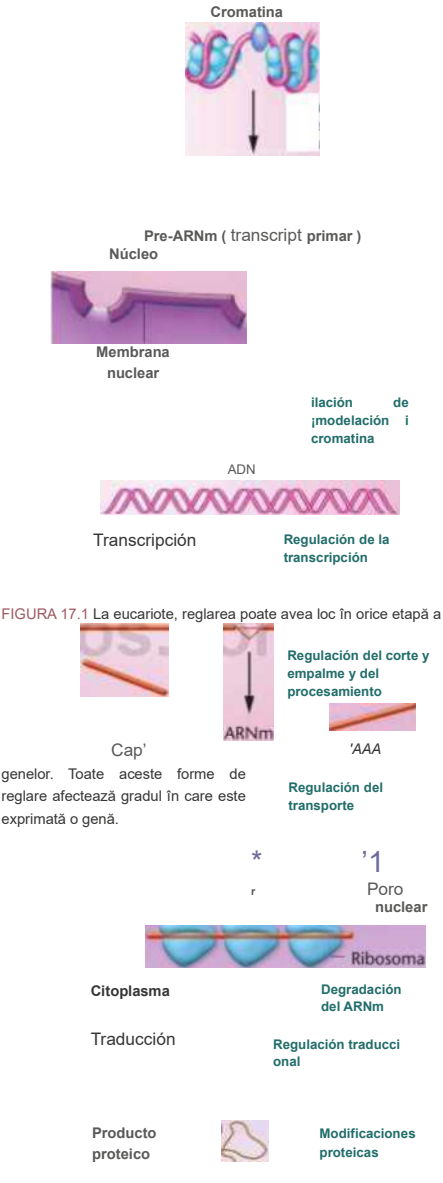


FIGURA 17.1 La eucariote, reglarea poate avea loc în orice etapă a expresiei genelor. Toate aceste forme de reglare afectează gradul în care este exprimată o genă.

Ele le permit să utilizeze mai multe tipuri de mecanisme de reglare genică decât sunt posibile în celulele procariote.

- Celulele eucariote conțin o cantitate mult mai mare de ADN decât celulele procariote, iar ADN-ul lor este asociat cu histone și alte proteine pentru a forma structuri de cromatină extrem de compacte într-un nucleu închis. Celulele eucariote modifică această organizare structurală pentru a influența expresia genelor.
- ARNm-urile majorității genelor eucariote trebuie scindate, terminate și poliadenilate înainte de a fi transportate în afara nucleului. Fiecare dintre aceste procese poate fi reglat pentru a influența numărul și tipurile de ARNm disponibile pentru traducere.
- Genele eucariote sunt situate pe mai mulți cromozomi (nu doar pe unul), iar acești cromozomi sunt închiși într-un nucleu delimitat de o membrană dublă. După transcripție, transportul ARN-urilor către citoplasmă poate fi reglat pentru a modula disponibilitatea ARNm pentru traducere.
- ARNm-urile eucariote pot avea o gamă largă de timpi de înjumătățire (t _{li}2). În schimb, majoritatea ARNm-urilor procariote se dezintegrează foarte rapid . Învechirea rapidă a ARNm-urilor permite celulelor procariote să răspundă rapid la schimbările de mediu. La eucariote, tipurile și cantitățile de ARNm din fiecare clasă celulară pot fi manipulate mai subtil, modificând ratele de dezintegrare ale ARNm pe o gamă mult mai largă de valori.
- La eucariote, rata de translație poate fi modulată, la fel ca și modul în care proteinele sunt procesate, modificate și degradate.

În secțiunile următoare, vom examina câteva dintre principalele modalități prin care expresia genelor este reglată în organismele eucariote. Ne vom limita discuția la reglarea genelor transcrise de ARN polimeraza II. Așa cum am discutat anterior în Capitolul 13, eucariotele utilizează trei ARN polimeraze diferite pentru transcripție. ARN polimeraza II transcrie gene care codifică toate ARNm-urile și unele ARN-uri nucleare mici, în timp ce ARN polimerazele I și III transcriu gene care codifică ARN-uri ribozomale, unele ARN-uri nucleare mici și ARN-uri de transfer. Genele transcrise de ARN polimerazele I și III sunt reglate diferit față de cele transcrise de ARN polimeraza II. Promotorii recunoscuți de fiecare tip de ARN polimerază au secvențe nucleotidice diferite și se leagă de factori de transcripție diferiți . În plus, genele transcrise de fiecare polimerază au semnale diferite de terminare a transcripției și mecanisme diferite de procesare a ARNm .

17.2

Rearanjamentele programate ale ADN-ului reglează expresia unui număr mic de gene

Dacă ignorăm modificările secvențelor datorate mutațiilor , ADN-ul genomic al majorității organismelor rămâne remarcabil de stabil. Cu toate acestea , în ciuda acestei stabilități genomice, există câteva exemple semnificative de reglare genică bazată pe rearanjarea - ADN-ului . În Capitolul 8 , am introdus subiectul amplificării ADN-ului și am văzut cum amplificarea unor gene specifice, cum ar fi genele *ARNr din* ovocitele de Xenopus , permite exprimarea acestor gene în stadii de dezvoltare , când sunt necesare niveluri ridicate ale acestor produse genetice .

Pe lângă amplificarea genelor, în timpul reglării unor gene eucariote în timpul dezvoltării , apar și alte tipuri de rearanjări programate ale ADN-ului . O astfel de rearanjare are ca rezultat crearea de noi gene din fragmente genetice situate în diferite poziții din genom . Un alt tip de rearanjare provoacă o modificare a expresiei genelor ca urmare a recombinării sau replicării ADN-ului. În aceste cazuri, aceste rearanjări ale ADN-ului sunt programate și esențiale pentru exprimarea normală a genelor implicate . În plus, apar și rearanjări care duc la pierderea unor secvențe de ADN , deși acest lucru se întâmplă doar în anumite tipuri de celule somatice din organismele eucariote superioare ; aceste modificări nu sunt , desigur, transmise urmașilor.

În această secțiune prezentăm un exemplu de reglare genică prin rearanjări programate ale ADN-ului: sistemul imunoglobulinei la om .

Sistemul imunitar și diversitatea anticorpilor

Sistemul imunitar protejează organismele împotriva infecțiilor și a substanțelor străine care pot pătrunde în fluxul sanguin sau în țesuturile corpului . Sistemul imunitar își îndeplinește sarcina prin recunoașterea moleculelor de pe suprafața acestor substanțe

străine și prin legarea fizică la ele ca o cheie care se potrivește într-o broască - un fenomen cunoscut sub numele de recunoaștere a antigenului. Antigenele sunt definite ca molecule, de obicei proteine, care declanșează un răspuns imun. Deși sistemul imunitar are multe componente, ne vom concentra asupra imunității umorale, care implică producerea de proteine numite imunoglobuline sau anticorpi, care se leagă direct de antigene .

Imunoglobulinele sunt sintetizate de un tip de celulă sanguină cunoscută sub numele de limfocit B, sau celulă B , care se dezvoltă și se maturizează în măduva osoasă. Moleculele de imunoglobulină sunt compuse din patru lanțuri polipeptidice ținute împreună prin legături disulfidice. Două dintre aceste polipeptide sunt lanțuri ușoare (L) identice , iar celelalte două sunt lanțuri grele (H) identice (Figura 17.2). Împreună , ele conferă imunoglobulinei o formă de Y. Fiecare dintre lanțurile ușor și greu conține o regiune constantă la capătul C-terminal al polipeptidei și o regiune variabilă la capătul N-terminal. Cele patru regiuni variabile, atunci când sunt combinate în cadrul moleculei de imunoglobulină, formează o structură distinctă care recunoaște un antigen specific. Fiecare celulă B sintetizează un singur tip de imunoglobulină .

Mamiferele sunt capabile să producă sute de milioane de tipuri diferite de anticorpi ca răspuns la o mare varietate de antigeni - de fapt , există mai multe tipuri de anticorpi decât gene în genom. Cum poate o diversitate atât de imensă să apară dintr-un număr limitat de gene? Răspunsul constă în faptul că ADN-ul care codifică genele imunoglobulinelor nu este fix, ci suferă multiple modificări programate, inclusiv deleții, translocații și mutații aleatorii.

gena lanțului ușor κ

ADN-ului contribuie la diversitatea anticorpilor, vom descrie formarea unui tip de genă a lanțului ușor al imunoglobulinei (gena lanțului ușor κ) la specia umană.

Gena lanțului ușor κ la om este asamblată în timpul dezvoltării celulelor B din mai multe regiuni de ADN situate de-a lungul cromozomului 2. În majoritatea celulelor somatice, precum și în celulele germinale , aceste regiuni de ADN sunt organizate așa cum se arată în Figura 17.3. Există între 70 și 10^{10} regiuni L (lider) și V (variabile) diferite, dintre care aproximativ jumătate sunt funcționale și pot codifica porțiunea variabilă (V) a moleculei lanțului ușor κ . *Fiecare* regiune LV este precedată de secvențe de inițiere a transcripției . Regiunile LV sunt situate la aproximativ 6 kilobaze distanță de regiunea J (joncțiune), o regiune care conține cinci posibili exoni care codifică J. Adiacent regiunii J , există o secvență enhancer care stimulează transcripția de la orice promotor situat în apropiere și un singur exon C care codifică regiunea constantă a moleculei κ a lanțului ușor .

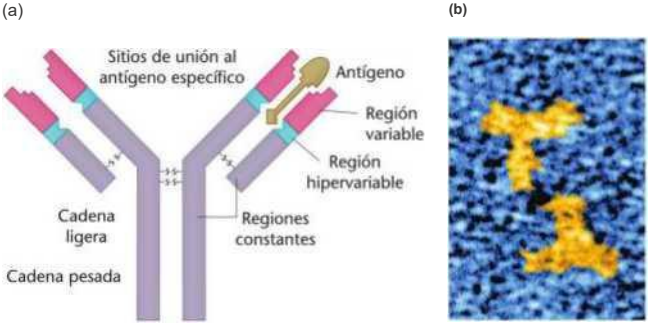


FIGURA 17.2 Estructura de las moléculas de inmunoglobulina. (a) Las moléculas de inmunoglobulina tienen forma de Y y están compuestas por cuatro cadenas de polipéptidos. Cada cadena contiene una región constante (púrpura), una región variable (roja) y una región hipervariable (azul). I as regiones variables e hipervariables forman un sitio de reconocimiento de antígenos que interactúa con un antígeno específico, como una llave que encajara en su cerradura. I as cadenas están unidas mediante enlaces disulfuro.
(b) Esta micrografía electrónica de barrido coloreada revela la estructura con forma de Y de las moléculas de inmunoglobulina que se han teñido en negativo antes de la microscopia electrónica.

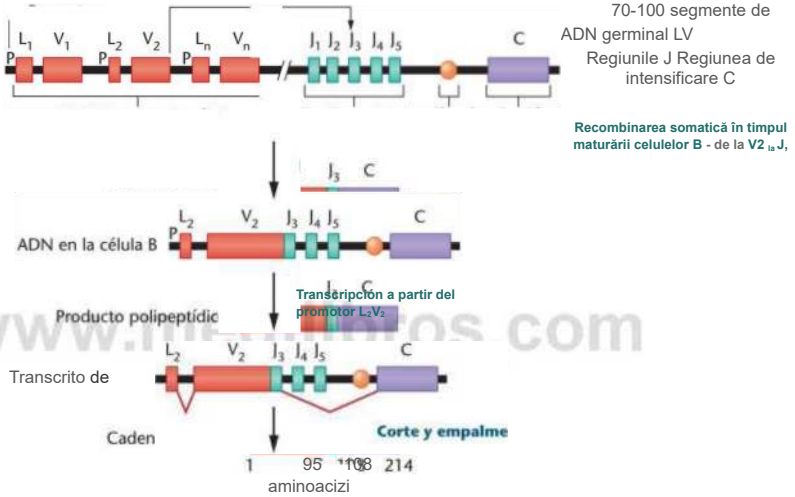


FIGURA 17.3 Asamblarea unei gene κ a lanțului ușor într-o celulă B, urmată de transcripția sa, procesarea ARNm , traducere și modificarea post-translațională. Gena celulei B conține o regiune LV (L2V2) recombinată cu o regiune J (J3). Regiunile rămase și intronul care conține amplificatorul sunt eliminate din transcript prin scindare intronică. După traducere, secvența lider (L2) este scindată pe măsură ce lanțul polipeptidic matur traversează membrana celulară.

În timpul dezvoltării unei celule B mature , una dintre regiunile LV (L2V in Figura 17.3), împreună cu promotorul său, este unită aleatoriu cu una dintre cele cinci regiuni J (J3 in exemplul nostru) printr-un eveniment de recombinare. Acest eveniment de recombinare șterge tot ADN-ul intermediar de pe cromozomul 2. În urma acestui eveniment de recombinare somatică, promotorul LV este activat de prezența amplificatorului imunoglobulinei în vecinătatea sa , rezultând transcripția genei . ARN-ul rezultat este îmbinat pentru a elimina intronii dintre regiunile L și V și dintre regiunile J și C. După traducerea ARNm, polipeptida este procesată prin eliminarea aminoacizilor lider (L). Gena κ rearanjată este apoi reținută și transmisă tuturor urmașilor acelei celule B.

Diversitatea anticorpilor este parțial rezultatul recombinării aleatorii a uneia dintre cele 35 până la 50 de regiuni funcționale diferite ale LV cu una dintre cele cinci regiuni J distincte . Două alte mecanisme cresc și mai mult nivelul de diversitate. Evenimentul de recombinare care unește o regiune LV cu o regiune J este imprecis și poate apărea în orice punct dintr-o regiune care conține mai multe perechi de baze . Din cauza acestei imprecizii, recombinarea dintre orice pereche dată de regiuni LV și J prezintă încă o variație considerabilă. În plus, regiunile V prezintă rate ridicate de mutație somatică aleatorie - hipermutație - în timpul dezvoltării celulelor B. Hipermutația introduce și mai multă variație în secvența regiunii LVJ. Mecanismele de rearanjare a

ADN-ului descrise aici pentru genele lanțului ușor κ la om acționează, de asemenea, în timpul formării genei care codifică un alt tip de genă a lanțului ușor (numită gena lanțului ușor X), precum și în timpul formării genei care codifică lanțurile grele ale imunoglobulinelor.

17.3 Expresia genelor în organismele eucariote este influențată de modificările cromatinei

Două caracteristici structurale ale genelor eucariote le disting de genele organismelor procariote. În primul rând, genele eucariote sunt situate pe cromozomi care ocupă o poziție distinctă în cadrul celulei - nucleul. Această captare și stocare a informațiilor genetice într-un compartiment discret permite proteinelor care reglează direct transcripția să rămână separate de cele implicate în traducere și alte aspecte ale metabolismului celular. În al doilea rând, așa cum este descris în Capitolul 12, ADN-ul eucariot se combină cu proteine histonice și non-histonice pentru a forma cromatina. Structura de bază a cromatinei este caracterizată de unități repetitive numite nucleozomi, care se înfășoară în fibre de 30 nm, care la rândul lor formează structuri și mai compacte. Prezența acestor structuri de cromatină inhibă multe procese, inclusiv transcripția, replicarea și repararea ADN-ului .

În această secțiune vom prezenta câteva dintre modalitățile prin care celulele eucariote modifică cromatina pentru a regla expresia genelor.

Teritorii cromozomiale și fabrici de transcripție

Dezvoltarea tehnicilor de pictare a cromozomilor a relevat faptul că nucleul interfazic nu este un sac plin de brațe cromozomiale încâlcite, ci mai degrabă o structură extrem de organizată. În nucleul interfazic, fiecare cromozom ocupă un domeniu discret numit teritoriu cromozomial și rămâne separat de ceilalți cromozomi . Canalele dintre cromozomi conțin puțin sau deloc ADN și se numesc compartimente intercromozomiale.

Cercetările sugerează că genele active transcripțional sunt situate la marginile teritoriilor cromozomiale, adiacente canalelor compartimentelor intercromozomiale . Oamenii de știință au emis ipoteza că această organizare ar putea duce la o asociere mai strânsă a genelor exprimate activ cu factorii de transcripție sau cu alte gene exprimate activ , facilitând astfel exprimarea lor coordonată .

O altă caracteristică a nucleului — fabrica de transcripție — poate contribui, de asemenea , la reglarea expresiei genelor . Fabricile de transcripție sunt situsuri nucleare care *conțin* cea mai mare parte a ARN polimerazei active și a moleculelor reglatoare de transcripție . Prin concentrarea proteinelor de transcripție și Genele transcrise activ în locații specifice din nucleu pot fi amplificate de capacitatea celulei de a exprima aceste gene.

Modificări ale histonei și remodelarea cromatinei nucleozomale

Capacitatea celulei de a modifica asocierea ADN-ului cu alte componente ale cromatinei este esențială pentru a permite - proteinelor reglatoare să acceseze ADN-ul. Prin urmare , modificarea cromatinei este un pas important în reglarea genelor . Modificarea cromatinei pare a fi o condiție prealabilă pentru transcrierea unor gene eucariote, deși poate apărea simultan cu - transcrierea altor gene.

Există două modalități generale de modificare a cromatinei . Prima implică modificări ale nucleozomilor, iar a doua implică modificări ale ADN-ului. În această secțiune, vom examina modificările componentei nucleozomale a cromatinei. În secțiunea următoare , vom prezenta modificări ale ADN-ului, în special metilarea ADN- ului .

Modificările compoziției nucleozomale pot afecta transcripția genelor . De exemplu , majoritatea nucleozomilor conțin histonele normale H2A și H3 . Unele regiuni promotoare ale genelor pot fi flancate de nucleozomi care conțin histone alternative, cum ar fi H2A.Z și H3.3. Acești nucleozomi alternativi ajută la menținerea regiunilor promotoare libere de nucleozomi represivi normali , facilitând astfel transcripția genelor .

Un al doilea mecanism de alterare a cromatinei implică modificarea histonei . O astfel de modificare este acetilarea, o alterare chimică a componentei histonice a nucleozomilor catalizată de enzimele histon acetiltransferază (HAT). Atunci când o grupare acetat este adăugată la aminoacizi bazici specifici din coada histonică, atracția dintre proteina histonică bazică și ADN- ul acid este redusă . Aceste modificări fac regiunile promotoare disponibile pentru legarea factorilor de transcripție care inițiază lanțul de

evenimente care duc la transcripția genelor . În unele cazuri, genele recrutează enzime HAT pe baza prezenței anumitor proteine activatoare de transcripție care se leagă de regiunile reglatoare ale transcripției . Desigur, ceea ce poate fi deschis poate fi și închis. În acest caz, histone deacetilazele (HDAC) îndepărtează grupările acetat din cozile histonice . Genele pot recruta enzime HDAC prin prezența anumitor proteine represoare în regiunile lor reglatoare. Pe lângă acetilare, histonele pot fi modificate și în alte moduri, inclusiv prin fosforilare și metilare .

Al treilea mecanism este remodelarea cromatinei , care implică repoziționarea sau îndepărtarea nucleozomilor din ADN și este realizată de complexe de remodelare a cromatinei . Nucleozomii repoziționați fac anumite regiuni cromozomiale accesibile proteinelor reglatoare ale transcripției , cum ar fi activatorii transcripției și ARN polimeraza II. Unul dintre cele mai bine studiate complexe de remodelare este complexul SWI / SNF . Remodelatorii precum SWI/SNF pot acționa în mai multe moduri diferite (Figura 17.4). Aceștia pot slăbi legătura dintre histone și ADN, determinând alunecarea nucleozomului de-a lungul ADN - ului și expunând regiunile reglatoare. Alternativ, aceștia pot detașa catena de ADN de nucleul nucleozomului sau pot provoca o reorganizare a componentelor interne ale nucleozomului. În toate cazurile , ADN-ul este expus temporar pentru a se asocia cu factorii de transcripție și ARN polimeraza.

Metilarea ADN-ului

Un alt tip de modificare a cromatinei care joacă un rol în reglarea genelor este adăugarea sau eliminarea grupărilor metil la bazele ADN-ului. ADN-ul majorității organismelor eucariote poate fi modificat după replicarea ADN-ului prin adăugarea mediată de enzime a grupărilor metil la baze și zaharuri. Cea mai mare parte a metilării ADN-ului are loc de obicei la poziția 5' a citozinei (5-meticozină), determinând gruparea metil să protrudeze în șanțul major al helixului ADN-ului . Metilarea are loc de obicei la citozina dubletelor C-G ale ADN- ului , de obicei pe ambele catene.

5' - ^{mCpG} - 3'

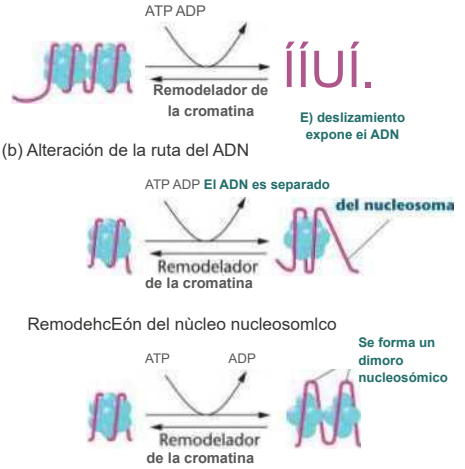
3r - GpC ^{m} - 5'

Potențial, secvențele CpG metilabile nu sunt distribuite aleatoriu în tot genomul, ci mai degrabă

(a) Alterarea contactelor ADN-histone

K)

de-a lungul ADN-ului . expunând regiunile reglatoare ale ADN-ului. (b)



Traiectoria ADN-ului în jurul unei particule centrale de nucleozom poate fi modificată. (c) Componentele particulei centrale de nucleozom pot fi rearanjate, rezultând o modificare suplimentară a centralei nucleozomului.

Acestea sunt concentrate în regiuni bogate în CpG numite insule CpG, situate la capetele 5' ale genelor, de obicei în regiunile promotoare. În genomul organismelor eucariote, aproximativ 5% din reziduurile de citozină sunt metilate.

Dovezile privind rolul metilării în exprimarea genelor eucariote se bazează pe o serie de observații. În primul rând, există o relație inversă între gradul de metilare și gradul de exprimare. Regiunile transcripționale mari, clonal inerte, ale genomului, cum ar fi - cromozomul X inactivat din celulele femele ale mamiferelor , tind să fie puternic metilate .

În al doilea rând, modelele de metilare sunt specifice țesuturilor și, odată stabilite, sunt ereditare pentru toate celulele țesutului respectiv. Se pare că modelele adecvate de metilare a ADN-ului sunt esențiale pentru dezvoltarea normală a mamiferelor . În ciuda acestei naturi ereditare , metilarea ADN-ului în regiuni genetice specifice poate fi modificată de enzimele metilază și demetilază pentru a reduce la tăcere sau a activa regiunile ADN .

FIGURA 1 7.4 Trei moduri în care remodelatorii cromatinei, cum ar fi complexul 5WVSNF, modifică asocierea nucleozomilor cu ADN-ul. (a) Contactele ADN-histonă se pot slăbi, permițând nucleozomilor să alunece

Poate cea mai directă dovadă a rolului medierii în exprimarea genelor provine din studii care utilizează analogi de bază. Nucleozida 5-azacitidina poate fi încorporată în ADN în locul citidinei în timpul replicării ADN-ului. Acest analog nu poate fi metilat, ceea ce duce la submetilare la locurile în care este încorporat. Încorporarea 5-azacitidinei în ADN modifică modelul de exprimare a genelor și stimulează exprimarea alelelor cromozomului X inactivat. În plus, prezența 5-azacitidinei în ADN poate induce exprimarea unor gene care în mod normal ar fi reduse la tăcere în anumite celule diferențiate.

Cum poate afecta metilarea reglarea genelor ? Datele din - studiile *in vitro* sugerează că metilarea poate reprima transcripția prin inhibarea legării factorilor de transcripție la ADN. Complexele represoare mediate de ADN pot, de asemenea, recruta complexe represoare de remodelare a cromatinei în regiunile reglatoare ale genelor.

ACUM REZOLVĂ ASTA

17.1 Celulele canceroase prezintă adesea modele anormale de - modificare a cromatinei . În unele tipuri de cancer, genele de reparare a ADN-ului *MLH1* și *BRCA1* sunt hipermetilate în regiunile lor promotoare. Explicați cum acest model anormal de metilare ar putea contribui la apariția cancerului .

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea tipurilor de gene care suferă mutații în celulele canceroase. Cheia rezolvării acesteia constă în analizarea modului în care metilarea afectează exprimarea genelor legate de cancer.*

17.4

Inițierea transcripției eucariote este reglată la nivel de situsuri specifice care acționează *în cis.*

Reglarea transcripției eucariote necesită legarea multor factori de reglare la secvențe specifice de ADN situate în și în jurul genelor, precum și la secvențe situate la distanțe mari. În această secțiune, vom discuta despre unele dintre secvențele de ADN - cunoscute sub numele de secvențe *cis* - care sunt necesare pentru transcripția precisă și reglată a genelor transcrise de ARN polimeraza II. În special, ne vom concentra pe elementele promotor, amplificator și silențiator . Așa cum am definit anterior în Capitolul 13, o secvență *cis* Este situat pe același cromozom ca și gena pe care o reglează. Acest lucru contrastează cu acțiunile factorilor *trans* . (cum ar fi proteinele care leagă ADN-ul), care pot regla o genă situată pe orice cromozom.

Elemente promoționale

Un promotor este o regiune a ADN-ului recunoscută de aparatul de transcripție și legată de una sau mai multe proteine care reglează inițierea transcripției. Promotorii sunt necesari pentru ca transcripția să înceapă cu precizie și la nivel bazal. Promotorii sunt adiacenți genelor pe care le reglează. Aceștia pot conține câteva sute de nucleotide și specifică locul sau locurile unde începe transcripția și direcția transcripției de-a lungul ADN-ului. În cadrul promotorilor se află o serie de elemente promotoare - secvențe scurte de nucleotide care se leagă de factori de reglare specifici.

În cadrul promotorilor eucarioți există două subcategorii : promotorul bazic care determină inițierea precisă a transcripției de către ARN polimeraza II și elementele promotorului proximal, care sunt cele care modulează eficiența nivelurilor bazale de transcripție .

Cercetările recente în bioinformatică au adăugat un nou nivel de complexitate înțelegerii noastre asupra promotorilor și a modului în care aceștia funcționează. Această cercetare relevă o mare diversitate în rândul promotorilor eucarioți, atât în ceea ce privește structura , cât și funcția lor . Se consideră acum că promotorii sunt fie centrați , fie *dispersați* . Promotorii *centrați* specifică situsul de începere a transcripției la un singur nucleotid (situsul de începere a transcripției). În schimb, promotorii dispersați direcționează inițierea dintr-o serie de situsuri de începere a transcripției slabe, situate într- o regiune lungă de 50 până la 100 de nucleotide (Figura 17.5). Inițierea transcripției centrate este tipul dominant de inițiere pentru majoritatea genelor din organismele eucariote inferioare, dar doar aproximativ 30% dintre genele vertebratelor utilizează acest tip de inițiere. Promotorii centrali sunt de obicei asociați cu gene ale căror niveluri de transcripție sunt puternic reglementate, în timp ce promotorii dispersați sunt asociați cu gene care sunt transcrise constitutiv.

Se cunosc puține lucruri despre elementele de ADN care alcătuiesc promotorii dispersați. Acești promotori se găsesc adesea în insulele CpG, ceea ce sugerează că modificările cromatinei pot influența inițierea de către acești promotori. În plus, promotorii dispersați nu conțin nucleozomi de-a lungul unei regiuni de 150 până la 200 de nucleotide.

Totuși, se cunosc mult mai multe despre structura promotorilor centrați. Secvența de ADN a acestora

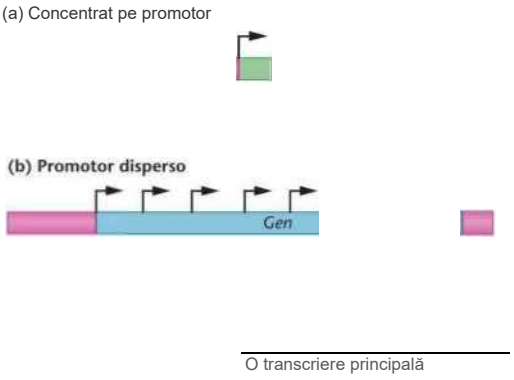


FIGURA 17.5 Promotori centrați și împrăștiați. Promotorii centrați (a) specifică un singur situs de început al transcripției . Promotorii împrăștiați (b) specifică o inițiere slabă a transcripției la situsuri multiple de început de-a lungul unei regiuni de aproximativ 100 de perechi de baze. Promotorii împrăștiați sunt comuni la vertebrate și sunt asociați cu gene constitutive. Locurile de început ale transcripției și direcțiile de transcripție sunt indicate prin săgeți.

Un promotor este compus din unul sau mai multe elemente, inclusiv Elementul Inițiator (Inr), caseta TATA, Elementul de Recunoaștere TFIIB (BRE), Elementul Promotor din Aval (DPE) și Elementul *Motiv Zece* (MTE). Locațiile și secvențele consens ale acestor elemente sunt rezumate în Figura 17.6. Fiecare dintre aceste elemente se găsește doar în anumiți promotori de bază; niciunul dintre ele nu este o componentă universală a tuturor promotorilor centrați. Funcția acestor elemente promotoare de bază este de a se lega de proteine specifice de inițiere a transcripției , care vor fi discutate în secțiunea următoare.

Elementul Inr include situsul de inițiere a transcripției , care se întinde aproximativ de la NUCLEOTIDELE -2 la 4-4 față de situsul de inițiere . La om , secvența Inr consensuală este YYAN ^{A}/ T $_{YY.}$ (unde Y indică orice nucleotidă pirimidinică și N indică orice nucleotidă). Situsul de inițiere a transcripției este primul reziduu A, situat la 4-1 . Caseta TATA este situată aproximativ la poziția -30 față de situsul de inițiere a transcripției și are secvența consens TATA ^{A}/ t $_{AAR}$ (unde R indică orice nucleotid purinic) . Deși cutia TATA este un element comun în promotorii procarioți și eucarioți, aceasta se găsește doar în aproximativ 15 % dintre promotorii genici bazici ai mamiferelor . BRE se găsește în unii promotori bazici , în poziții imediat în amonte sau imediat în aval de cutia TATA . Secvențele motivelor MTE și DPE sunt situate în aval de situsul de început al transcripției , aproximativ la pozițiile 4-18 până la 4-27 și respectiv 4-28 până la 4-33 . Majoritatea promotorilor bazici care conțin un DPE conțin și un element Inr; cu toate acestea, au fost descoperiți unii promotori bazici care conțin și cutii TATA. Secvența motivului MTE poate fi prezentă împreună cu elementul Inr , dar poate apărea și în promotorii bazici cu cutii TATA și / sau secvențe motive DPE .

Mulți promotori conțin elemente promotoare proximale , situate în amonte de secvențele motivelor TATA și BRE, iar aceste elemente lucrează împreună cu cele ale promotorului bazic pentru a crește rata bazală de transcripție . De exemplu , caseta CAAT este un element promotor proximal comun . Caseta CAAT are secvența consens CAAT sau CCAAT și este de obicei situată la 70 până la 80 de perechi de baze în amonte de situsul de start . Analiza mutațională sugerează că casetele CAAT (atunci când sunt prezente) sunt esențiale pentru ca promotorul să inițieze transcripția. Mutațiile de pe

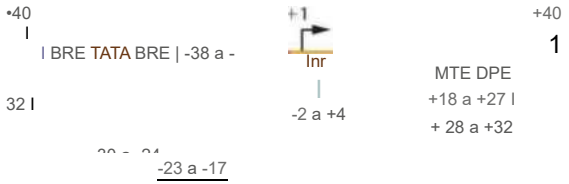


FIGURA 17.6 Elementos del promotor básico que se pueden encontrar en los promotores centrados. Los elementos del promotor básico suelen localizarse entre los nucleótidos -40 y +40, respecto del sitio inicio de la transcripción, marcado como +1. Ninguno de estos elementos es universal, y un promotor básico puede contener solo uno de estos elementos o varios de ellos. BRE es el elemento de reconocimiento de TFIIB, que puede localizarse a uno u otro lado de la caja TATA. Esta está marcada en la figura como TATA, Inr es el elemento iniciador, MTE es el elemento motif ten y DPE es el elemento promotor corriente abajo.

ambele părți ale acestui element nu au niciun efect asupra transcripției, în timp ce mutațiile din cadrul secvenței CAAT reduc considerabil rata de transcripție. Figura 17.7 rezumă efectele asupra transcripției mutațiilor din caseta CAAT și din alte elemente promotoare. Caseta GC este un alt element întâlnit frecvent în secvențele promotoare și are secvența consens GGGCGG. Aceasta este situată într -una sau mai multe copii la aproximativ poziția -110. Casetele CAAT și GC funcționează oarecum ca intensificatori, pe care îi vom discuta în secțiunea următoare.

Intensificatoare și amortizoare de zgomot

Transcripția genelor eucariote este reglată nu numai de secvențele promotorilor, ci și de secvențe de ADN numite amplificatoare. Amplificatoarele pot fi localizate pe ambele părți ale unei gene, la distanță de genă sau chiar în interiorul genei însăși. La fel ca promotorii , acestea sunt regulatoare cis - active , deoarece funcționează atunci când sunt localizate pe același cromozom ca și genele structurale pe care le reglează . În timp ce secvențele promotorilor sunt esențiale pentru transcripție la nivel bazal, amplificatoarele sunt necesare pentru a atinge nivelul maxim de transcripție . În plus, amplificatoarele sunt responsabile pentru exprimarea genelor specifică unui anumit moment sau țesut . Prin urmare, există un grad de analogie între amplificatoare și regiunile operator la organismele procariote; cu toate acestea, amplificatoarele sunt mai complexe atât ca structură , cât și ca funcție.

Oamenii de știință au studiat promotorii și amplificatorii - analizând efectele pe care mutațiile specifice le au asupra transcripției genelor clonate introduse în celule cultivate. De asemenea, au mutat aceste elemente în poziții noi în raport cu genele care codifică genele cu care sunt asociate . Aceste studii au relevat mai multe caracteristici care disting promotorii de amplificatori:

1. Poziția unui amplificator nu trebuie să fie fixă în raport cu gena pe care o reglează; amplificatorul va funcționa indiferent dacă se află în amonte, în aval sau în interiorul genei.
2. Orientarea unui intensificator poate fi inversată , fără ca acest lucru să aibă un efect semnificativ asupra performanței sale.
3. situat adiacent unei gene este mutat experimental în orice altă locație din genom sau dacă o genă fără legătură este plasată lângă un amplificator , transcripția noii gene adiacente este amplificată .

Un exemplu de amplificator situat *în gena* pe care o reglează este amplificatorul genei lanțului greu al imunoglobulinei , care este situat într-un intron între doi exoni. Acest amplificator este activ numai în celulele care exprimă gene ale imunoglobulinei, ceea ce indică faptul că expresia genelor dependente de țesut poate fi modulată de amplificator. Un exemplu de amplificator din aval ar fi amplificatorul genei β3-globinei. La pui , un amplificator situat între gena β3-globinei și gena β-globinei funcționează

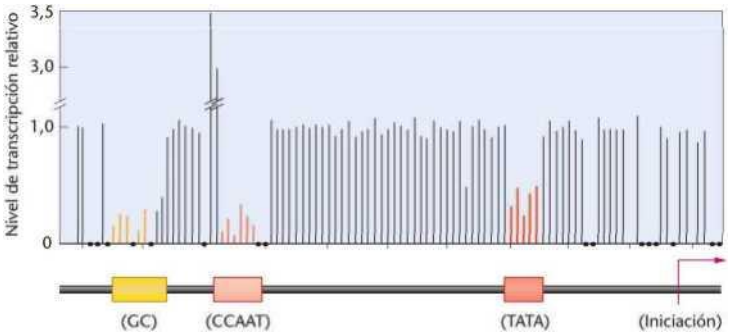


FIGURA 17.7 Resumen de los efectos sobre los niveles de transcripción que tienen diferentes mutaciones puntuales en la región promotora del gen de la /3-globina. Cada línea representa el nivel de transcripción observado en cada experimento independiente, efectuando una mutación de un único nucleótido (en relación con el tipo silvestre) en una ubicación concreta. Los puntos representan nucleótidos para los que no se obtuvo ninguna mutación. Observe que las mutaciones que se producen dentro de elementos específicos del promotor son las que tienen los mayores efectos sobre el nivel de transcripción.

într- o direcție pentru a controla transcripția genei β3-globinei în timpul dezvoltării embrionare și în direcția opusă pentru a regla expresia genei β3-globinei în timpul vieții adulte.

Amplificatorii sunt modulari și conțin adesea mai multe secvențe scurte distincte de ADN. De exemplu, amplificatorul virusului SV40 (care este transcris într-o celulă eucariotă) are o structură complexă constând din două secvențe adiacente de aproximativ 100 de perechi de baze fiecare , situate la aproximativ 200 de perechi de baze în amonte de un situs de inițiere a transcripției . Fiecare dintre cele două regiuni de 100 de perechi de baze conține mai multe secvențe motive care contribuie la atingerea ratei maxime de transcripție . Ștergerea oricăreia dintre aceste regiuni nu are niciun efect asupra transcripției; cu toate acestea, ștergerea ambelor reduce considerabil transcripția *in vivo* .

regulator al transcripției cu acțiune cis , *silențiatorul* , acționează asupra genelor eucariote pentru a reprima rata de inițiere a transcripției. Silențiatorii, la fel ca amplificatorii, sunt elemente cu acțiune *cis,* compuse din secvențe scurte de ADN care afectează rata de inițiere a transcripției de la un promotor asociat. Aceștia acționează adesea în moduri specifice țesutului sau timpului pentru a controla expresia genelor .

17,5

Inițierea transcripției eucariote este reglată de factori de transcripție care se leagă de situsurile de legare *cis*

În general, este acceptat faptul că situsurile de reglare care acționează în cis - inclusiv promotorii, amplificatorii și amortizorii - influențează inițierea transcripției acționând ca situsuri de legare pentru proteinele reglatoare ale transcripției. Aceste proteine reglatoare, cunoscute sub numele de factori de transcripție, pot avea efecte diverse și complexe asupra transcripției. Unii factori de transcripție cresc nivelurile de inițiere a transcripției și sunt cunoscuți sub numele de activatori, în timp ce alții scad nivelurile de transcripție și sunt cunoscuți sub numele de represori.

Efectele activatorilor și represorilor pot fi reglate cu precizie la fiecare tip de celulă adecvat, fie ca răspuns la semnalele de mediu, fie în stadiul corect de dezvoltare. Pentru a realiza acest lucru, unii factori de transcripție pot fi prezenți doar în anumite tipuri de celule, reglând astfel genele țintă pentru a atinge niveluri de expresie specifice țesutului. Unii factori de transcripție sunt exprimați în celule doar în momente specifice de dezvoltare sau ca răspuns la anumite semnale externe sau interne. În unele cazuri, un factor de transcripție care se leagă de un situs de legare *cis* și reglează o anumită genă poate fi prezent într- o celulă și se poate chiar lega de situsul său de legare *cis corespunzător* , dar va deveni activ numai atunci când este modificat structural (de exemplu , prin fosforilare) sau prin legarea la o altă moleculă , cum ar fi un hormon. Aceste modificări ale factorilor de transcripție pot fi , de asemenea, reglate în moduri specifice țesutului sau unui anumit moment. În plus, diferiți factori de transcripție pot concura pentru a se lega de aceeași secvență de ADN sau de una dintre cele două secvențe care se suprapun. Concentrațiile factorilor de transcripție din celulă și puterea cu care fiecare factor se leagă de ADN vor dicta ce factor se leagă în cele din urmă și, prin urmare , vor determina nivelul de inițiere a transcripției dictat de factorul care se leagă cu succes . În cele din urmă, mai mulți factori de transcripție care se leagă de diverse elemente amplificatoare și promotori din regiunea de reglare a unei gene pot interacționa între ei pentru a ajusta mai precis nivelurile și momentul inițierii transcripției.

Gena HA a metalotioneinei umane: factori multipli de transcripție și elemente care acționează *în cis*

metalotioneinei IIA *(hMTIIA)* Gena umană oferă un exemplu al modului în care transcripția genelor poate fi reglată prin interacțiunea mai multor elemente promotoare și amplificatoare și a factorilor de transcripție care se leagă de acestea. Produsul genei *hMTIIA* este o proteină care se leagă de metale grele , cum ar fi zincul și cadmiul , protejând astfel celulele de efectele toxice ale concentrațiilor mari ale acestor metale. De asemenea, este implicată în protejarea celulelor de efectele stresului oxidativ. Gena este exprimată la niveluri scăzute în toate celulele , dar este transcrisă la niveluri ridicate atunci când celulele sunt expuse la metale grele sau hormoni steroizi , cum ar fi glucocorticoizii .

Elementele de reglare ale funcționării *cis* care controlează - transcripția genei *hMTIIA* Acestea includ elemente promotoare, intensificatoare și supresoare (Figura 17.8). Fiecare element cu *acțiune* cis Este o secvență scurtă de ADN care are specificitatea necesară pentru a se lega de unul sau mai mulți factori de transcripție .

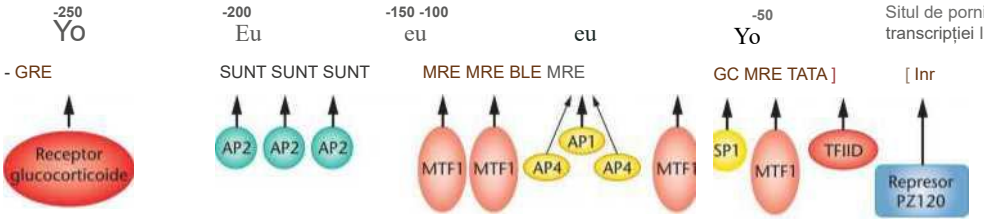


FIGURA 17.8 Regiunile promotor și amplificator ale genei metalotioneinei HA umane. Aceste regiuni conțin multiple *situsuri de reglare cu acțiune cis*. Factorii de transcripție care controlează atât nivelurile bazale, cât și cele induse ale transcripției MTIIA sunt indicați sub genă, cu săgeți care indică situsurile lor de legare.

Gena *hMTIIA* conține elementele promotoare de bază Inr și TATA box, care specifică inițierea transcripției. Vom descrie factorii care se leagă de promotorii de bază în următoarea secțiune a acestui capitol. Elementul promotor proximal, GC, se leagă de factorul SP1, care este prezent în permanență în majoritatea celulelor eucariote și stimulează transcripția la niveluri scăzute în majoritatea celulelor. Nivelurile de expresie bazală sunt, de asemenea, reglate de regiunile BLE (element bazal) și ARE (element de răspuns al factorului AP), care pot fi considerate elemente enhancer . Aceste elemente *cis* - active se leagă de proteinele activatoare 1, 2 și 4 (API, AP2 și AP4), care sunt prezente la niveluri variabile în diferite tipuri de celule și pot fi activate ca răspuns la semnalele de creștere extracelulară. Elementul BLE conține situsuri de legare suprapuse pentru factorii API și AP4, oferind un grad de selectivitate în modul în care acești factori stimulează transcripția *hMTIIA* atunci când se leagă de BLE în diferite tipuri de celule. Prezența amplificatorilor MRE (elementul de răspuns metalic) și GRE (elementul de răspuns glucocorticoid) stimulează niveluri ridicate de transcripție. Factorul de transcripție inductibil de metale 1 (MTF1) se leagă de elementul MRE ca răspuns la prezența metalelor grele. Proteina receptorului glucocorticoid se leagă de GRE, dar numai atunci când acea - proteină receptor este legată și de hormonul steroid glucocorticoid. Receptorul glucocorticoid este localizat în mod normal în citoplasma celulară; cu toate acestea, când hormonul glucocorticoid intră în citoplasmă, se leagă de receptor, provocând o modificare conformațională care permite receptorului să intre în nucleu , să se lege de GRE și să stimuleze transcripția hMTIIA . Pe lângă faptul că este activată, transcripția genei *hMTIIA* poate fi, de asemenea, reprimată prin acțiunea proteinei represoare PZ120, care se leagă de regiunea de începere a transcripției .

Prezența mai multor regulatori și factori de transcripție care se leagă de aceștia permite genei *hMTIIA* să fie activată sau reprimată transcripțional ca răspuns la modificări subtile atât în condițiile extracelulare, cât și intracelulare .

Domeniile funcționale ale factorilor de transcripție eucarioți

Am descris factorii de transcripție ca proteine care se leagă de ADN și activează sau reprimă inițierea transcripției . Aceste acțiuni sunt realizate datorită prezenței domeniilor funcționale (grupuri de aminoacizi care îndeplinesc o funcție specifică) în cadrul fiecăreia dintre aceste proteine. Unul dintre domenii, domeniul de legare a ADN-ului , se leagă de secvențe specifice de ADN prezente în situsul de reglare cis . Celălalt domeniu, domeniul ***de trans*** -activare sau domeniul de trans -represie , activează sau reprimă *transcripția* . Domenii de activare în trans Represiunea *trans* și represia își ating efectele prin interacțiunea cu alți factori de transcripție sau cu ARN polimeraza, așa cum vom vedea în secțiunea următoare .

Domeniile de legare a ADN-ului ale factorilor de transcripție eucarioți prezintă mai multe motive structurale tridimensionale caracteristice . Exemplele includ motivul helix -turn-helix (HTH), degetul de zinc și motivul leucină - zig bazic (bZIP) .

Motivul helix -turn-helix (HTH) , prezent atât în factorii de transcripție procarioți, cât și în cei eucarioți , este caracterizat printr-o anumită conformație geometrică, mai degrabă decât printr -o secvență distinctă de aminoacizi . Prezența a două *helici* α separate printr-o „răsucire" a mai multor aminoacizi (de unde și numele motivului) permit proteinei să se lege de ADN.

Motivul degetului de zinc se găsește într-o gamă largă de factori de transcripție care reglează expresia genelor legate de creșterea, dezvoltarea și diferențierea celulară . O proteină tipică cu deget de zinc conține grupuri de două cisterne și două histidine la intervale repetitive

. Aceste grupuri se leagă de atomii de zinc, se pliază pentru a forma bucle și interacționează cu secvențe specifice de ADN .

Motivul fermoarului de leucină de bază (bZIP) conține o regiune numită fermoar de leucină care permite dimerizarea proteină-proteină. Când două molecule care conțin bZIP se dimerizează, reziduurile de leucină se intersectează ca un fermoar. Dimerul rezultat conține două regiuni β-elicoidale de bază adiacente fermoarului care se leagă de reziduurile de fosfat și specifică baze la situsul lor de legare a ADN-ului.

Factorii de transcripție conțin, de asemenea, domenii de activare *trans sau* de represie *trans* , diferite de domeniile lor de legare a ADN-ului. Aceste domenii pot cuprinde între 30 și 100 de aminoacizi.

17,6

Activatorii și represorii interacționează cu factorii generali de transcripție la nivelul promotorului

Până acum, am discutat primii pași în reglarea transcripției la organismele eucariote : în primul rând, cromatina trebuie remodelată și modificată pentru a permite proteinelor reglatoare ale transcripției să se lege de situsurile lor specifice care acțiune cis ; în al doilea rând, o serie de factori de transcripție se leagă de situsurile *care* acțiune cis și exercită efecte pozitive și negative asupra ratei de inițiere a transcripției - adesea ca răspuns la semnale extracelulare sau în moduri specifice țesutului sau perioadei de timp . Următoarea întrebare pe care trebuie să o luăm în considerare este: cum influențează aceste elemente reglatoare care acțiune *cis și* factorii lor de legare a ADN- ului inițierea transcripției ? Pentru a răspunde la această întrebare, trebuie mai întâi să descriem modul în care ARN polimeraza II eucariotă și factorii săi generali de transcripție se asamblează în promotori .

Formarea complexului de inițiere a transcripției ARN polimerazei II. Pentru a inița transcripția la nivel bazal sau intensificat , sunt necesare la nivelul promotorului mai multe proteine numite factori generali de transcripție. Aceste proteine se asamblează într-o ordine specifică, formând un complex de preinițiere a transcripției (PIC) , care oferă o platformă pentru ARN polimeraza II pentru a se lega de un promotor și a inița transcripția . În explicațiile noastre, vom restricționa exemplul nostru de formare a PIC la cazul promotorilor în cutie TATA - tipul de promotor pentru care avem în prezent cele mai multe informații.

Factorii generali de transcripție care asistă ARN polimeraza II la un promotor bazic sunt numiți TFIID (factor de transcripție pentru ARN polimeraza II) . TFIIB, TFIIA, TFIIE, TFIIF, TFIIH și Mediator. Factorii generali de transcripție și interacțiunile acestora cu promotorul bazic și cu ARN polimeraza II sunt rezumate în Figura 17.9

Primul pas în formarea unui complex PIC este legarea TFIID la unul sau mai multe elemente ale promotorului bazic . TFIID este un complex cu subunități multiple care

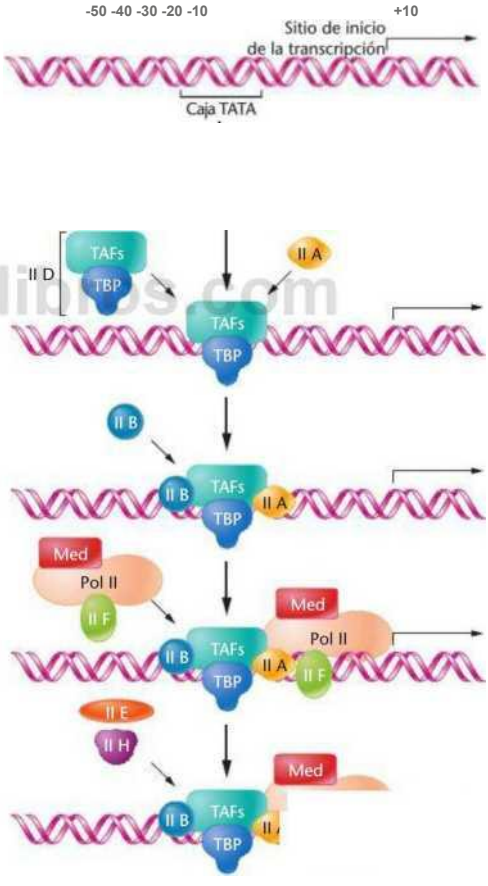


FIGURA 17.9 Ansamblul factorilor generali de transcripție necesari pentru inițierea transcripției de către ARN polimeraza II.

Acesta conține TBP (proteină de legare a TATA) și aproximativ 13 proteine TAF (factori asociați cu TBP). După cum sugerează și numele, TBP se leagă de cutia TATA. În plus, acest set de factori TAF se leagă de elementele Inr, precum și de elementele DPE și MTE. TFIIA interacționează cu TFIID și ajută la legarea TFIID de promotorul bazic. Odată ce TFIID a intrat în contact cu promotorul bazic, TFIIB se leagă de elementele BRE de pe una sau ambele părți ale cutiei TATA . După ce TFIID și TFIIB s - au legat de promotorul bazic , factorii generali de transcripție rămași interacționează cu ARN polimeraza II și ajută la recrutarea acestuia la promotor. Complexul PIC complet format mediază desfășurarea ADN-ului promotorului la locul de pornire și tranziția ARN polimerazei II între inițierea transcripției și elongație. ARN polimeraza lasă apoi promotorul liber pe măsură ce se mișcă de-a lungul șablonului de ADN într-un complex de elongație. Mai mulți factori generali de transcripție (în special TFIID, TFIIE, TF1IH și Mediator) rămân în promotorul de bază pentru a ajuta la pregătirea următorului complex PIC.

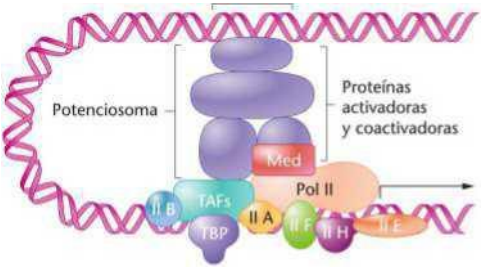


FIGURA 17.10 Formarea unei bucle de ADN permite factorilor de legare a amplificatorului sau a silențioarezului, situați la o oarecare distanță de un promotor , să interacționeze cu factorii generali de transcripție din complexul de pre - inițiere și să regleze nivelul transcripției .

Interacțiunile factorilor generali de transcripție cu activatori și represori

Activatorii și represorii transcripției pot crește sau reduce rata de inițiere a transcripției în diverse moduri . O modalitate prin care activatorii și represorii pot influența transcripția este prin legarea la cromatină în cadrul promotorului unei gene. Odată legați, aceste proteine pot recruta complexe de remodelare a cromatinei . Complexele de remodelare pot deschide regiunile promotorului pentru a permite interacțiuni suplimentare cu mecanismul de transcripție , cum ar fi PIC, sau pot modifica cromatina pentru a forma structuri represive care inhibă inițierea transcripției .

O a doua modalitate prin care activatorii și represorii pot afecta transcripția este prin contactul direct cu factorii generali de transcripție și prin amplificarea sau inhibarea capacității acestor factori generali de transcripție de a se asocia cu un promotor. Unii activatori , atunci când sunt legați de amplificatori, interacționează cu alte proteine numite coactivatori într-un complex cunoscut sub numele de amplificator . Potențiosomul intră apoi în contact cu unul sau mai mulți factori generali de transcripție din PIC, pliind ADN-ul intermediar sau determinându-l să formeze o buclă (Figura 17.10). Prin creșterea ratei de asamblare a PIC sau prin influențarea stabilității sale, activatorii transcripției stimulează rata de inițiere .

Intensificator

al transcripției. În schimb, transcripția poate fi reprimată prin acțiunile proteinelor represoare legate de elemente de silențiere a ADN-ului . Represorii pot inhiba formarea unui PIC, pot stimula sau recruta proteine de remodelare a cromatinei care creează structuri represive de cromatină sau pot bloca asocierea elementelor de reglare a unei gene cu activatori sau cu PIC.

Pe lângă remodelarea cromatinei și formarea complexului PIC , activatorii transcripției pot crește rata de desfășurare a ADN-ului în cadrul genei și pot accelera eliberarea ARN polimerazei de la promotor în regiunea transcrisă a genei .

ACUM REZOLVĂ ASTA

17.2 Hormonul estrogen transformă proteina receptorului estrogen (RE) , transformând-o dintr-o moleculă inactivă într- un factor de transcripție activ . RE se leagă de situsurile de legare *cis*- legate . care acționează ca amplificatori și sunt localizați în apropierea promotorilor diferitelor gene . În unele țesuturi, prezența estrogenului pare să activeze transcripția genelor țintă ale RE , în timp ce în alte țesuturi , se pare că reprimă transcripția aceleași gene. Oferiți o explicație a modului în care s-ar putea întâmpla acest lucru.

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care - funcționează amplificatorii și represorii transcripției. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a multiplelor moduri în care factorii transacționali pot interacționa cu amplificatorii pentru a provoca modificări în inițierea transcripției .*

17.7

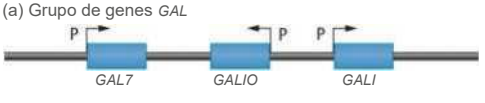
Reglarea genelor într-un organism model: transcripția genelor GAL de drojdie

Unul dintre primele sisteme model utilizate pentru a studia reglarea genelor eucariote a fost sistemul genetic *GAL* . La drojdie, sistemul *GAL* este format din patru gene structurale *(GALI, GALIO, GAL2* și *GAL7)* și trei gene reglatoare *(GAL4, GAL80* și *GAL3).* Produșii - genelor structurale transportă galactoza în celulă și metabolizează zahărul. Produșii genelor reglatoare controlează transcripția genelor structurale atât pozitiv, cât și negativ.

Transcripția genelor *GAL structurale* este inductibilă - adică transcripția este reglată de prezența sau absența substratului , care este galactoza. În absența galactozei, genele *GAL structurale* nu sunt transcrise. Dacă se adaugă galactoză în mediul de cultură, transcripția începe imediat, iar concentrația de ARNm crește de o mie de ori. Mutațiile nule ale genei reglatoare GAL4 împiedică - activarea , indicând faptul că transcripția este sub control pozitiv - adică proteina activatoare trebuie să fie prezentă pentru a activa transcripția genelor. În această secțiune, vom examina modul în care transcripția a două gene *GAL, GALI* și *GALIO,* este reglată pozitiv . [Figura 17.1 1(a)].

Transcripția acestor două gene este controlată de o regiune centrală de control numită UAS $_G$ (secvența de activare din amonte a genelor *GAL*) de aproximativ 170 de perechi de baze. La drojdie , elementele UAS sunt similare din punct de vedere funcțional cu amplificatorii găsiți în organismele eucariote superioare . Structura cromatinei UAS $_G$ este constitutiv deschisă, ceea ce înseamnă că este hipersensibilă la DNază și, prin urmare , lipsită de nucleozomi. În cadrul UAS G $_{\text{există}}$ patru situsuri de legare pentru proteina Gal4 (Gal4p), care este codificată de gena *GAL4* . Aceste situsuri sunt ocupate permanent de Gal4p, indiferent dacă genele *GALI* și *GALIO* sunt transcrise. Gal4p este, la rândul său, reglat negativ de proteina Gal80 (Gal80p), care este produsul *genei GAL80.*

În absența galactozei, Gal80p este întotdeauna legat de Gal4p, acoperind domeniul de transcripție al Gal4p, care este prezentat în Figura 17.11 (b) ca o pată întunecată. Activarea transcripției are loc atunci când galactoza interacționează cu proteina Gal3 (Gal3p), codificată de gena GAL3 . La legarea la galactoză, molecula Gal3p suferă o modificare conformațională care îi permite să



(b)

Constitutivamente sensible a la

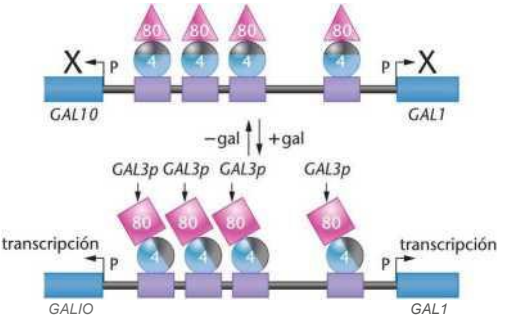


FIGURA 17.11 Modelo de la activación transcripcional de *GAL1 y GALIO,* (a) La estructura de la región del genoma de levadura que contiene tres de los genes *GAL —CAL7, GALIO y GALI.* Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción y las direcciones de transcripción. Las regiones promotoras están marcadas como «P». (b) La región UAS$_G$ de los genes *GALIO y GAL1.* La región UAS$_G$ tiene cuatro sitios de unión para Gal4p, que se muestran como cuadrados púrpura. Las moléculas de Gal4p se muestran como círculos azules *y* las moléculas de Gal80p se muestran como triángulos o cuadrados rojos. La inducción se indica mediante un cambio en la conformación de Gal80p *y* en su asociación con Gal4p, lo que deja expuesto el dominio de la transcripción de Gal4p.

interacționează cu complexul Gal4p/Gal80p care este legat de UAS $_G$. Această interacțiune rupe asocierea Gal4p cu Gal80p, expunând domeniul de activare al Gal4p .

Gal4p este o proteină compusă din 881 de aminoacizi . Include un domeniu de legare a ADN-ului care recunoaște și se leagă de secvențele de ADN UAS $_{G \text{ și un}}$ domeniu *de trans -activare.* care activează transcripția [Figura 17.12(a)]. Cercetătorii au identificat aceste domenii funcționale prin efectuarea deleților în gena *GAL4* și testarea produselor genetice pentru a determina capacitatea lor de a se lega de ADN și de a activa transcripția [Figura 17.12 (b)].

Datele din numeroase studii sugerează că activarea transcripției rezultă din interacțiunile dintre domeniile de activare ale Gal4p și alte proteine . Cercetările arată că primul factor în

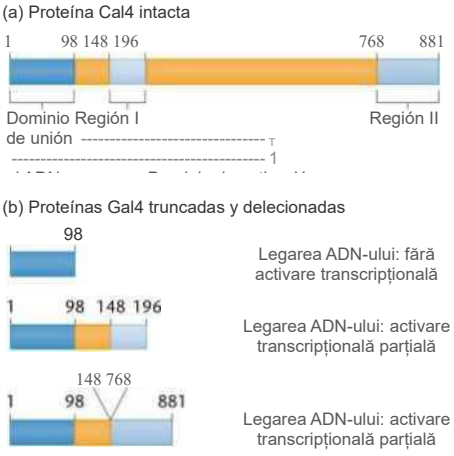


FIGURA 17.12 Structura și funcția activatorului Gal4p. (a) Gal4p conține un domeniu de legare a ADN-ului, reprezentat în albastru închis, și două regiuni de activare transcripțională, reprezentate în albastru deschis. Regiunea de legare a Gal80p se află în regiunea de aminoacizi 851-881. (b) Efectele diferitelor deleții asupra activității Gal4p.

Interacțiunea cu promotorul Gal implică un coactivator cunoscut - sub numele de SAGA, care se asociază direct cu Gal4p. După recrutarea SAGA, factorul general de transcripție Mediator interacționează cu Gal4p și intră în complex. În cele din urmă, TFIID, TFIIH, TFIIE și TFIIF, precum și ARN polimeraza II, sunt recrutate într-un complex PIC la nivelul *promotorilor GAL.* O altă etapă stimulată de Gal4p este remodelarea nucleozomală. Gal4p recrutează complexul de remodelare nucleozomală SWI/SNF la *promotorii GAL,* urmată de îndepărtarea nucleozomilor din promotor.

17,8

Reglarea genelor post-transcripționale are loc în toate etapele, de la procesarea ARN-ului până la modificarea proteinelor

Am indicat deja că reglarea expresiei genelor are loc în multe puncte diferite de-a lungul căii de la ADN la proteină . Deși controlul transcripțional exercită principalul efect asupra reglării genelor la eucariote, reglarea post-transcripțională joacă un rol la fel de semnificativ, sau chiar mai semnificativ. Înainte de traducere, transcrierile ARNm eucariote pot fi procesate prin îndepărtarea intronilor necodificatori , tăierea și îmbinarea precisă a exonilor rămași, adăugarea unui capac 5' la ARNm și sintetizarea unei cozi poli-A la capătul 3' . ARN-ul mesager matur este apoi exportat în citoplasmă , unde este tradus și ulterior degradat. Fiecare dintre acești pași poate fi reglat pentru a controla cantitatea unui produs proteic . În plus, stabilitatea și activitatea produsului proteic respectiv pot fi reglate .

În această secțiune , vom examina câteva mecanisme de reglare genetică post-transcripțională care sunt deosebit de importante în - organismele eucariote : controlul mecanismelor alternative de splicing , stabilitatea ARNm și translația. Într-o secțiune ulterioară, vom discuta o metodă recent descoperită de reglare genetică post-transcripțională - reducerea la tăcere a ARN- ului .

splicing alternativ al ARNm-ului

Splicing-ul alternativ poate genera diferite forme de ARNm din molecule de pre-ARNm identice , astfel încât exprimarea aceleiași gene poate da naștere la proteine diverse , cu funcții similare sau diferite.

Modificările modelelor de splicing pot avea multe efecte diferite asupra proteinei traduse. Chiar și modificări mici pot altera activitatea enzimatică a proteinei , capacitatea de legare a receptorilor sau locația acesteia în cadrul celulei .

Figura 17.13 prezintă exemplul de splicing alternativ al pre - ARNm transcris din gena calcitoninei/ peptida legată de gena calcitoninei (*gena* CT / CGRP). În celulele tiroidiene, transcriptul *primar CT/CGRP este* îmbinat astfel încât ARNm matur să conțină doar primii patru exoni. În aceste celule, semnalul de poliadenilare al exonului 4 este utilizat pentru a procesa ARNm și a adăuga coada poli - A . Acest ARNm este tradus în peptida calcitonină , un hormon peptidic cu 32 de aminoacizi implicat în reglarea calciului. În creier și sistemul nervos periferic , transcriptul primar CT */CGRP este* îmbinat pentru a include exonii 5 și 6, dar nu și exonul 4. În aceste celule, situsul *de* poliadenilare al exonului 6 este recunoscut. ARNm CGRP Codifică o peptidă formată din 37 de aminoacizi , care are activități hormonale într -o gamă largă de țesuturi. Prin splicing alternativ, doi hormoni peptidici cu structuri, locații și funcții diferite sunt sintetizați din aceeași genă .

Splicing-ul alternativ crește numărul de proteine care pot fi produse din

fiecare genă .

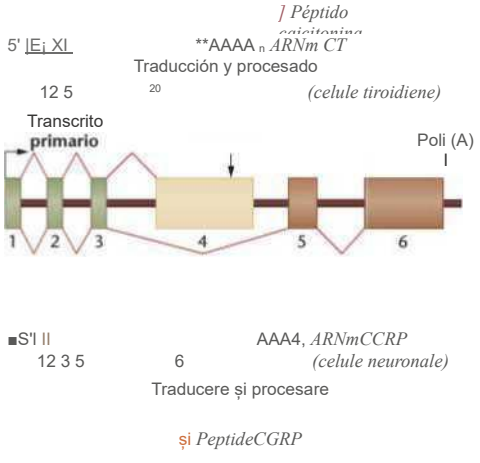


FIGURA 1 7.1 3 Splicing alternativ al *transcriptului genei CT/CGRP.* Transcriptul primar prezentat în centrul diagramei conține șase exoni. Transcriptul primar poate fi splicing pentru a forma două ARNm diferiți, ambele conținând primii trei exoni, dar diferă prin exonii lor terminali.* ARNm CT conține exonul 4, polidenilarea având loc la sfârșitul celui de-al patrulea exon. ARNm CGRP conține exonii 5 *și* 6, polidenilarea având loc la sfârșitul exonului 6. ARNm CT este produs în celulele tiroidiene. După traducere, proteina rezultată este procesată pentru a produce peptida cicitonină. Invers, ARNm *CGRP este produs în* celulele neuronale *și* După traducere, produsul său proteic este procesat pentru a obține peptida CGRP.

Prin urmare, numărul de proteine pe care un organism le poate produce – proteina sa – nu se potrivește cu numărul de gene din genom, iar diversitatea proteinelor poate depăși numărul de gene cu un ordin de mărime. Splicing-ul alternativ se găsește la toate tipurile de moluște, dar este deosebit de frecvent la vertebrate, inclusiv la oameni.* Oamenii de știință estimează că cel puțin două treimi din genomul uman pot fi supus unor mecanisme de splicing alternativ.

Prin urmare , oamenii pot produce câteva sute de mii de proteine diferite (sau poate mai mult) din cele aproximativ 25.000 de gene conținute în genomul haploid.

Având în vedere existența unor mecanisme alternative de splicing , câte polipeptide diferite pot fi obținute din același pre-ARNm? Un răspuns la această întrebare vine din cercetările asupra genei *Dscam* la *Drosophila.* În timpul dezvoltării, celulele sistemului nervos trebuie să se conecteze între ele cu precizie .* Chiar și la *Drosophila,* Cu doar aproximativ 250.000 de neuroni, aceasta este o sarcină formidabilă. Neuronii au structuri celulare numite axoni care formează conexiuni cu alte celule nervoase . Gena *Dscam* Gena Dscam din *Drosophila* codifică o proteină care ghidează creșterea axonilor, asigurând că neuronii se conectează corect între ei. În pre-ARNm al Dscam, exonii 4, 6, 9 și 17 sunt compuși fiecare dintr-o serie de alternative posibile (Figura 17.14). Acestea sunt tăiate și îmbinate împreună pentru a forma ARNm matur într -un mod unic, astfel încât fiecare axon este reprezentat de doar una dintre alternativele sale posibile . Există 12 alternative pentru exonul 4; 48 pentru exonul 6; 33 pentru exonul 9; și 2 pentru exonul 17. Numărul de combinații posibile care ar putea fi formate în acest mod sugerează că, teoretic , gena *Dscam* poate produce 38.016 proteine distincte. Deși acesta este un număr impresionant de ARNm distincte posibile și izoforme proteice diferite , oare sistemul nervos *al Drosophilei are nevoie* cu adevărat de toate aceste alternative? Cercetări recente sugerează că acesta este într-adevăr cazul.

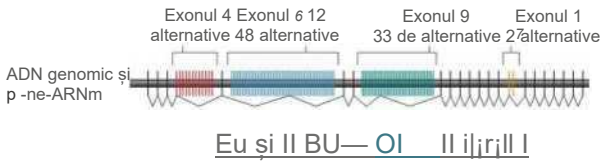


FIGURA 17.14 Splicing alternativ al *ARNm-ului genei Dscam.* (Sus) Organizarea genei *Dscam* la *Drosophila melanogaster* și a pre-ARNm-ului transcris. Gena *Dscam* codifică o proteină care ghidează creșterea axonilor în timpul dezvoltării. Fiecare ARNm va conține unul dintre cei 12 exoni posibili corespunzători exonului 4 (roșu), unul dintre cei 48 de exoni posibili ai exonului 6 (albastru), unul dintre cei 33 de exoni posibili ai exonului 9 (verde) *și* unul dintre cei *2 exoni* posibili ai exonului 17 (galben). Numărând toate combinațiile posibile ale acestor exoni, gena *Dscam* ar putea codifica 38.016 versiuni diferite ale proteinei DSCAM.

Proteină-WimW

© 2MŮ Elsevier

Oamenii de știință au demonstrat că fiecare neuron exprimă un subset distinct de izoforme ale proteinei Dscam. În plus, studiile *in vitro* arată că fiecare izoformă a proteinei Dscam se poate lega de aceeași izoformă a proteinei Dscam , dar nu și de altele. Chiar și o mică modificare a secvenței de aminoacizi reduce sau elimină legarea dintre două molecule Dscam. Studiile *in vivo* arată că celulele care exprimă aceleași izoforme Dscam interacționează între ele. Prin urmare, se pare că diversitatea izoformelor proteinei Dscam din neuroni oferă un fel de carte de identitate moleculară pentru fiecare neuron, ajutându-l să navigheze către ținta corectă și împiedicând încurcarea extensiilor diferiților neuroni.

Un exemplu mai extrem este oferit de *para,* o altă genă exprimată în sistemul nervos al genei *Drosophia* . Nu numai că are cel puțin șase situsuri alternative de splicing , ceea ce duce la 48 de variante distincte de ARNm posibile, dar suferă și o altă modificare post-transcripțională numită editare ARN la 11 poziții. Editarea ARN implică substituții de baze care au loc după transcripție și splicing. Luând în considerare atât splicing-ul alternativ , cât și - editarea, gena *pentru [proteina ARN*] poate produce teoretic peste un milion de transcrieri diferite .

Genomul *Drosophila* conține aproximativ 13.000 de gene, dar gena *Dscam* singură poate produce de 2,5 ori mai multe proteine. Întrucât splicing-ul alternativ este mult mai frecvent la vertebrate, combinațiile de proteine care pot fi obținute din genomul uman nu pot fi astronomice.

Tăierea și îmbinarea alternativă și bolile umane

Mutațiile care afectează reglarea mecanismului de splicing contribuie la diverse boli genetice. O astfel de boală, distrofia miotonică, oferă un exemplu al modului în care defectele - mecanismului alternativ de splicing al ARN-ului pot duce la o gamă largă de simptome. Distrofia miotonică (DM) este cea mai frecventă formă de distrofie musculară la adulți, afectând aproximativ una din 8.000 de persoane. Este o tulburare autosomal dominantă care apare în două forme - DM1 și DM2. Ambele tulburări prezintă o gamă largă de simptome, inclusiv atrofie musculară, miotonie (dificultate de relaxare a mușchilor) , rezistență la insulină , cataractă, atrofie testiculară, tulburări comportamentale și cognitive, afecțiuni miocardice și tumori ale foliculilor de păr .

DM1 este cauzată de expansiunea secvenței repetitive de trinucleotide CTG în regiunea 3' netradusă a genei *DMPK* . La persoanele neafectate, gena *DMPK* Aceasta conține între 5 și 35 de copii ale secvenței repetitive CTG , în timp ce la pacienții cu diabet zaharat de tip 1, gena conține între 150 și 2.000 de copii. Severitatea simptomelor este direct legată de numărul de copii ale secvenței repetitive. Diabetul zaharat de tip 2 este cauzat de o expansiune a secvenței repetitive CCTG în primul intron al genei *ZNF9* . Persoanele afectate pot avea până la 11.000 de copii ale secvenței repetitive din intronul *ZNF9.* În diabetul de tip 2, severitatea simptomelor nu este legată de numărul de repetiții.

Recent, oamenii de știință au descoperit că diabetul de tip 1 și de tip 2 nu sunt cauzate de modificări ale produselor proteice ale genelor *DMPK* sau *ZNF9 ,* ci de efectele toxice ale ARN-urilor lor care conțin repetițiile. Aceste ARN-uri se acumulează și formează incluziuni în nucleu. În cazul *ZNF9,* doar secvența repetitivă CCUG se acumulează în nucleu , deoarece restul intronului este degradat după ce gena este îmbinată . Se pare că ARN -urile acumulate se leagă de și sechestrează anumite proteine - proteine care în mod normal ar fi implicate în reglarea modelelor alternative de îmbinare ale unui număr mare de alte ARN-uri. Aceste alte ARN-uri includ acele produse necesare pentru buna funcționare a mușchilor și a țesutului nervos . Până în prezent, oamenii de știință au descoperit peste 20 de gene care sunt îmbinate și tăiate incorect în mușchii, inima și creierul pacienților cu diabet de tip 1. Adesea, la pacienții cu diabet zaharat de tip 1 și de tip 2, modelele de splicing caracteristice stadiului de dezvoltare fetală sunt active , iar tranziția normală către modelele de splicing la adult nu are loc . Aceste efecte asupra reglării mecanismelor de splicing ale ARN-ului sunt cunoscute sub numele de spliceopatii .

Alte boli umane sunt cauzate de expansiunile repetițiilor trinucleotidice. Două dintre acestea , sindromul X fragil și boala Huntington , sunt discutate în capitolele 8 și, respectiv, 24 .

Determinarea sexului în *Drosophila:* un model alternativ de reglare a tăierii și splicingului

Așa cum s-a menționat în Capitolul 7, sexul la *Drosophila* este determinat de raportul dintre cromozomii X și autozomi (X:A). Când raportul este 0,5 (1X:2A) , se produc masculi , chiar și fără un cromozom Y; când raportul este 1,0 (2X:2A), se produc femele . Rapoartele intermediare (2X:3A) au ca rezultat organisme intersex. Rapoartele cromozomiale sunt interpretate de un grup mic de gene, care inițiază o cascadă de evenimente de splicing ce au ca rezultat

producerea de celule somatice masculine sau feminine și fenotipurile masculine sau feminine corespunzătoare. Cele mai importante trei gene din această cale sunt Sxl , *transformer* (fr) și *doublesex* (dsx). Să analizăm câțiva dintre pașii cheie ai acestui proces.

Gena reglatoare situată la începutul acestei cascade (Figura 17.15) este gena *letală sexuală* (5x1), care codifică o

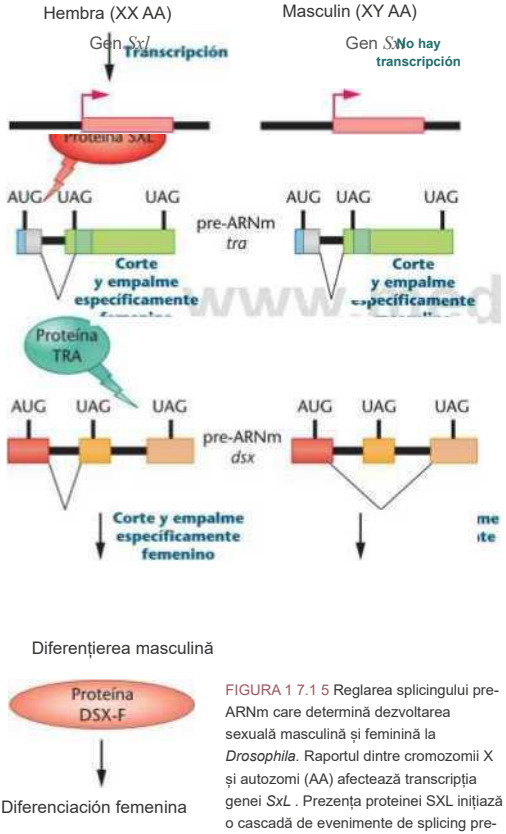


FIGURA 1 7.1 5 Reglarea splicingului pre-ARNm care determină dezvoltarea sexuală masculină și feminină la *Drosophila*. Raportul dintre cromozomii X și autozomi (AA) afectează transcripția genei *SxL* . Prezența proteinei SXL inițiază o cascadă de evenimente de splicing pre-ARNm care culminează cu exprimarea genelor specific feminine *și* producerea factorului de transcripție DSX-F. În absența proteinei SXL, un model specific masculin de splicing pre-ARNm are ca rezultat modele specific masculine de exprimare genică induse de proteina de legare a ARN-ului DSX-M. La femele, se consideră că factorii de transcripție codificați de genele de pe cromozomul X activează transcripția genei SxL. La masculi, concentrația mai mică a acestor factori de transcripție este insuficientă pentru a activa transcripția SxL. Ca urmare a reglării transcripționale diferențiale , proteina SXL este exprimată numai în embrionii feminini. Prezența (la femele) sau absența (la masculi) proteinei SXL inițiază o cascadă de evenimente de splicing pre -ARNm specifice femelelor și masculilor. În prezența SXL, sunt exprimate modele de splicing feminine , care predomină față de modelele de splicing masculine predeterminate .

Una dintre țintele proteinei SXL este pre-ARNm codificat de gena *transformatoare* (tra). Acest pre-ARNm este transcris atât în celulele masculine, cât și în cele feminine. Când proteina SXL este prezentă, pre-ARNm-urile *tra* sunt îmbinate pentru a produce -

ARNm maturi care sunt traduși în proteina TRA funcțională. Dacă SXL este absent, pre-ARNm-urile *tra sunt îmbinate astfel încât* un codon stop al translației să rămână în ARNm-ul matur . Translația acestui ARNm are ca rezultat o proteină trunchiată, nefuncțională. SXL perturbă modelul de îmbinare al pre - ARNm -ului tra prin legarea la pre-ARNm și afectarea capacității mecanismului de îmbinare de a recunoaște semnalele de îmbinare .

Următoarea genă din cascadă, *doublesex* (dsi), reprezintă un punct critic de control în dezvoltarea fenotipului sexual . Aceasta produce un ARNm funcțional și o proteină atât la femele, cât și la masculi. Cu toate acestea, pre -ARNm este procesat într-o manieră specifică sexului, producând transcrieri diferite și, prin urmare, proteine dsx diferite . La femele, proteina TRA funcțională acționează ca un factor de splicing care se leagă de pre-ARNm *dsx și...* Acesta direcționează splicing-ul conform unui model specific feminin . La masculi, nu este prezentă proteina TRA, iar splicing-ul pre-ARNm dsx are ca rezultat un ARNm și o proteină specific masculine. Proteina DSX feminină (DSX-F) și proteina DSX masculină (DSX- M) sunt ambele factori de transcripție , dar acționează în moduri diferite. DSX-F reprimă transcripția genelor ale căror produse controlează dezvoltarea sexuală masculină , în timp ce DSX-M activează transcripția genelor ale căror produse controlează dezvoltarea sexuală feminină . În plus, DSX-M reprimă transcripția genelor care controlează dezvoltarea sexuală feminină .

În concluzie, produsul genei Sx acționează ca un comutator care selectează căile de dezvoltare sexuală prin controlul splicingului transcriptului dsx . Proteina SXL este produsă numai în embrionii care au un

raport X:A egal cu 1. Eșecul controlului splicingului transcriptului *dsx* în modul feminin duce la splicingul transcriptului în modul masculin implicit, ceea ce duce la producerea unui fenotip masculin.

ACUM REZOLVĂ ASTA

17.3 Unele mutații în gena *tra* a genei *Drosophila* determină ca femelele XX să pară masculi. În schimb, alte mutații *tra* determină ca musculițele masculi XY să pară femele normale. Care dintre aceste fenotipuri ar fi de așteptat dacă o mutație în *tra* ar avea ca rezultat o alelă nulă? Care ar fi de așteptat dacă mutația ar produce un produs al genei *tra* constitutiv activ ?

- **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea căii SXL la Drosophila. Cheia rezolvării acesteia este analizarea funcțiilor proteinei TRA normale la Drosophila mascul și femelă.*

Controlul stabilității ARNm

Nivelul stării staționare a unui ARNm este cantitatea acelui ARNm prezentă în celulă, care este determinată de o combinație între rata la care gena este transcrisă și rata la care ARNm este degradat. Nivelul stării staționare determină cantitatea de ARNm disponibilă pentru translație. Toate moleculele de ARNm sunt degradate la un moment dat după sinteza lor, dar durata de viață a unui ARNm, definită în termeni de timp de înjumătățire , poate varia foarte mult între diferite ARNm și poate fi reglată ca răspuns la nevoile celulei.

O moleculă de ARNm poate fi degradată prin trei căi generale. În primul rând, o moleculă de ARNm poate fi vizată pentru degradare de către enzime care scurtează coada poli-A. În ARNm-urile nou sintetizate, coada poli-A are aproximativ 200 de nucleotide lungime și este legată de o proteină cunoscută sub numele de proteina de legare a poli-A. Legarea acestei proteine la coada poli-A ajută la stabilizarea ARNm-ului. Dacă coada poli-A este scurtată la mai puțin de aproximativ 30 de nucleotide , ARNm devine instabil și acționează ca substrat pentru exonucleazele care degradează ARN-ul fie în direcția 5' către 3', fie în direcția 3' către 5'. În al doilea rând, enzimele de decapare pot îndepărta capacul 7-metilguanozină, ceea ce face ca ARNm să fie instabil. În al treilea rând, un ARNm poate fi, de asemenea, scindat intern de către o endonudază, rezultând capete neprotejate unde poate avea loc degradarea de către exonucleaze. Exemple de scindare endonudeazălitică includ cea care are loc în timpul degradării *mediate* de nonsens (NMD). și cele cauzate de interferența ARN (pe care le vom discuta în Secțiunea 17.9). Degradarea ARNm mediată de proteine non - sens are loc atunci când traducerea se termină la codoni stop prematuri. Endonucleazele atacă ARNm în apropierea codonului stop , lăsând capetele neprotejate care sunt apoi degradate de exonucleaze . Degradarea mediată de proteine non-sens este un mecanism important pentru îndepărtarea moleculelor de ARNm mutate care, dacă sunt traduse eficient, ar putea duce la acumularea de produse proteice aberante .

Care sunt mecanismele prin care poate fi reglată stabilitatea ARNm? O modalitate de a modifica timpul de înjumătățire al unui ARNm este prin intermediul unor elemente specifice ale secvenței de ARN care recrutează complexe de degradare sau stabilizare. Un element de stabilizare a ARNm bine studiat este elementul bogat în adenină-uracil (ARE) - un segment de ribonucleotide compus din A și U. Aceste elemente bogate în AU sunt de obicei situate în regiunile 3' netraduse ale moleculelor de ARNm care au timpi de înjumătățire scurti și reglați. Aceste ARNm care conțin ARE - codifică proteine implicate în creșterea celulară sau controlul transcripțional , iar cantitatea lor trebuie reglată rapid. În celulele care nu cresc sau care necesită niveluri scăzute de exprimare genică, complexe specifice se leagă de elementele ARE ale acestor molecule de ARNm, provocând scurtarea cozii poli-A și degradarea rapidă a ARNm. Se estimează că aproximativ 10% din ARNm-urile de la mamifere conțin aceste elemente de instabilitate .

Reglarea translațională și post-translațională

Scopul final al expresiei genelor este prezența unui produs genetic activ. Există numeroase modalități prin care poate fi reglată - cantitatea de activitate a unui produs genetic . În unele cazuri, traducerea unui ARNm poate fi reglată pentru a produce cantitatea corectă de produs proteic. În alte cazuri, stabilitatea unei proteine poate fi modulată sau proteina poate fi modificată după traducere pentru a-i schimba structura și a - i afecta activitatea.

Un exemplu important de reglare post-translațională este cel al proteinei p53. Această proteină este esențială pentru protejarea celulelor normale de efectele deteriorării ADN-ului și ale altor tipuri de stres. Este un factor de transcripție care crește transcripția diferitelor gene ale căror produse sunt implicate în oprirea ciclului celular , repararea ADN-ului și moartea celulară programată. În condiții normale, nivelurile de p53 sunt

extrem de scăzute în celule, iar p53 prezentă se află într-o stare inactivă. Când celulele suferă deteriorări ale ADN-ului sau stres metabolic, nivelul proteinei p53 crește dramatic. În plus, p53 devine un factor de transcripție activ .

Modificările nivelurilor și activității p53 rezultă dintr-o combinație între creșterea stabilității proteinelor și modificări ale proteinei în sine. În celulele care nu sunt supuse stresului, p53 este legat de o altă proteină numită Mdm2 . Mdm2 se leagă de domeniul de activare transcripțională al p53, blocând capacitatea acestuia de a induce transcripția. În plus , Mdm2 acționează ca o ubiquitină ligază, adăugând reziduuri de ubiquitină la p53. Ubiquitina (o moleculă „ubicută") este o proteină mică care marchează alte proteine pentru degradarea de către enzimele proteolitice. Prezența ubiquitinei pe p53 are ca rezultat degradarea p53. Când celulele sunt supuse stresului , Mdm2 și p53 sunt modificate prin fosforilare și acetilare, rezultând eliberarea Mdm2 din p53. În consecință, proteinele p53 se stabilizează, nivelurile de p53 cresc, iar proteina este capabilă să acționeze ca un factor de transcripție. Un nivel suplimentar de control este faptul că p53 este un factor de transcripție care induce transcripția genei Mdm2 . Prin urmare , prezența proteinei p53 active creează o buclă de feedback negativ care generează mai multă proteină Mdm2, ceea ce readuce rapid p53 la starea sa inactivă, rară.

17,9

Silențierea ARN controlează expresia genelor în mai multe moduri

În ultimul deceniu, descoperirea faptului că moleculele mici de ARN controlează expresia genelor a dat naștere unui nou domeniu de cercetare. Inițial descoperite la plante, moleculele scurte de ARN, lungi de aproximativ 21 de nucleotide, sunt acum cunoscute ca reglatoare ale expresiei genelor în citoplasma plantelor, animalelor și fungilor prin reprimarea traducerii și provocarea degradării ARNm. Această formă de reglare post-transcripțională specifică secvenței este cunoscută sub numele de interferență ARN (ARNi). Mai recent, cercetătorii au descoperit că există și ARN-uri scurte care acționează în nucleu, modificând structura cromatinei și provocând represia transcripțională. Împreună, aceste fenomene sunt cunoscute sub numele de amortizare genetică indusă de ARN. Vom sublinia câteva dintre caracteristicile de bază ale amortizării genetice induse de ARN, ținând cont de faptul că acest domeniu se extinde și avansează într- un ritm extraordinar . De asemenea, vom discuta despre unele dintre modurile în care ARNi este utilizat în biotehnologie și medicină.

ARNi a fost descoperit pentru prima dată în timpul cercetărilor de laborator care studiau expresia genelor la plante și animale. Într -un proiect de cercetare , Drew Fire și Craig Mello au injectat celule de nematode *(Caenorhabditis elegans)* cu ARNi . molecule de ARN monocatenare sau bicatenare , ambele conținând secvențe complementare ARNm - ului genei *unc-22* . Deși cercetătorii se așteptau ca moleculele de ARN antisens monocatenare să suprime expresia genei unc -*22* Prin legarea la ARNm sens endogen , au fost surprinși să descopere că injectarea de ARN unc - *22* bicatenar a fost între 10 și 100 de ori mai puternică în reprimarea expresiei ARNm unc - *22* . Ei au studiat fenomenul în continuare și și-au publicat rezultatele în revista *Nature.* În 1998, aceștia au raportat că prezența ARN -ului bicatenar (ARNd) degradează ARNm-ul dacă acesta este complementar secvenței uneia dintre catenele ARNd - ului . Doar câteva molecule de ARNd sunt suficiente pentru a provoca degradarea unor cantități mari de ARNm. Cercetările lui Fire și Mello au deschis o ramură surprinzătoare și nouă a biologiei moleculare, cu implicații de amploare pentru potențiale aplicații practice. Pentru cercetarea lor asupra ARNi , au primit Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 2006 .

Mecanisme moleculare ale silențierii genelor induse de ARN

Există două tipuri de molecule scurte de ARN implicate în reducerea la tăcere a genelor indusă *de* ARN : ARN-uri mici interferente (siARN *)* și microARN-uri (miARN). Deși sursele lor diferă , mecanismele lor de acțiune sunt similare. Ambele tipuri de ARN sunt molecule scurte , dublu catenare , cu o lungime cuprinsă între 21 și 24 de ribonucleotide. ARN-urile mici (sARN) sunt derivate din molecule de ARN dublu catenare , mai lungi, liniare, situate în citoplasma celulei. În natură, acești precursori ai ARN-ului mic (sARN) apar în celule ca urmare a infecției virale sau a expresiei transpozonilor - ambele sintetizează molecule de ARN dublu catenare ca parte a ciclului lor de viață . ARN - urile mici pot fi o metodă prin care celulele recunosc și dezactivează aceste ARN - uri dublu catenare , protejând organismul de amenințări interne sau externe . O altă sursă de molecule de ARN mic este chiar laboratorul de cercetare . Oamenii de

știință sunt acum capabili să introducă ARN dublu catenar în celule în scopuri terapeutice sau de cercetare. În citoplasmă , moleculele de ARN dublu catenar sunt recunoscute de un complex enzimatic cunoscut sub numele de Dicer și sunt tăiate de Dicer în molecule de ARNsi.

microARN-urile sunt derivate din ARN monocatenar transcris din nucleu din propriul genom al celulei și care conține o structură dublu catenară de tip stem-loop . Enzimele nudează din nucleu recunosc aceste structuri stem-loop și le scindează de ARN-ul monocatenar mai lung . Fragmentele de ARN cu structură stem-loop sunt exportate din nucleu în citoplasmă , unde sunt ulterior procesate de complexul Dicer pentru a produce molecule de microARN scurte, liniare, dublu catenare . În ultimii ani, oamenii de știință au descoperit că un număr semnificativ de genomuri eucariote sunt transcrise de ARN polimeraza II pentru a produce produse de ARN care nu conțin cadre de citire deschise și nu sunt traduse în produse proteice. Aceste ARN-uri sunt transcrise fie din secvențe situate în intronii altor gene care codifică proteine, fie din propriii lor promotori. Până în prezent, peste 700 dintre aceste gene ARN necodificatoare au fost descoperite în genomul uman. *Arabidopsis* are peste 130, iar C. *elegans* are peste 100. Aceste numere sunt probabil o subestimare. Oamenii de știință cred că genomurile eucariote ar putea conține mii de gene transcrise în molecule scurte de ARN necodificatoare , care ar putea regla expresia a peste jumătate din totalul genelor care codifică proteine . Se estimează că 30 % din genele umane sunt cel puțin parțial reglate de mecanisme legate de microARN .

reglează negativ aceste ARN-uri necodificatoare expresia genelor ? Diversele căi implicate în reducerea la tăcere a genelor indusă de ARN sunt prezentate în Figura 17.16.

Calea ARNi are mai multe etape. În primul rând, moleculele de siARN sau miARN se asociază cu un complex enzimatic numit complex de silențiere indus de ARN (RISC). În al doilea rând, în cadrul RISC , molecula scurtă de ARN dublu catenară este - denaturată, iar catena sens este degradată. În al treilea rând, complexul ARN/RISC devine un agent ARNi funcțional și extrem de specific , căutând molecule de ARNm care sunt complementare ARN-ului antisens conținut în RISC. În acest moment, ARNi poate lua una dintre cele două rute posibile. Dacă ARN-ul antisens din RISC este perfect complementar ARNm-ului, RISC va scinda ARNm-ul. ARNm-ul scindat este apoi degradat de ribonucleaze. Dacă ARN-ul antisens din RISC nu este exact complementar ARNm -ului, complexul RISC rămâne legat de ARNm, interferând cu capacitatea ribozomilor de a traduce ARNm -ul. Prin urmare, mecanismul ARNi poate reduce la tăcere expresia genelor prin afectarea stabilității sau a traducerii ARNm-ului .

Pe lângă reprimarea translației ARNm și degradarea ARNm , siARN-urile și microARN-urile pot reprima și transcripția anumitor gene și a unor regiuni mai mari ale genomului. Acestea fac acest lucru prin asocierea cu un complex distinct - complexul de inițiere a transcripției indus de ARN (RITS) . Catena de ARN antisens din cadrul RITS direcționează complexul RITS către promotori genetici specifici sau către regiuni mai mari ale cromatinei . RITS recrutează apoi enzime de remodelare a cromatinei în aceste regiuni. Aceste enzime metilează histonele și ADN-ul, ducând la formarea heterocromatinei și la reducerea transcripțională ulterioară . Ca urmare a efectelor lor asupra reducerii transcripționale a genelor mediate de cromatină , se consideră că moleculele de microARN sunt implicate în fenomene epigenetice , cum ar fi imprimarea genelor și inactivarea cromozomului X.

Căile ARNi sunt, de asemenea, capabile să reprime transcripția în anumite moduri indirecte . ARNm-urile factorilor de transcripție sunt ținte frecvente ale silențierii mediate de ARNi . Atunci când nivelurile factorilor de transcripție specifici sunt reduse într -o celulă, transcripția genelor a căror expresie depinde de acești factori este, de asemenea, reprimată .

Studii recente demonstrează că mecanismele de reducere a tăcerii genice induse de ARN funcționează în timpul dezvoltării normale și controlează expresia rețelelor de gene implicate în diferențierea celulară specifică țesuturilor . În plus , oamenii de știință au descoperit că activitatea normală a microARN contribuie la dezvoltarea cancerului , diabetului și bolilor de inimă .

Reducerea la tăcere a genelor indusă de ARN în biotehnologie și medicină

Recent, geneticienii au aplicat ARNi ca instrument puternic de cercetare . Tehnologia ARNi permite cercetătorilor să creeze în mod specific defecte într -o singură genă , fără a fi nevoie să inducă mutații genetice ereditare . Reducerea la tăcere a genelor mediată de ARNi este relativ specifică și ieftină și permite oamenilor de știință să analizeze rapid funcția genelor . Câteva zeci de companii furnizoare științifice produc acum molecule ARNi sintetice cu secvențe de ribonucleotide specifice utilizării în cercetare . Aceste molecule pot fi introduse în culturi celulare pentru a elimina produse genetice specifice.

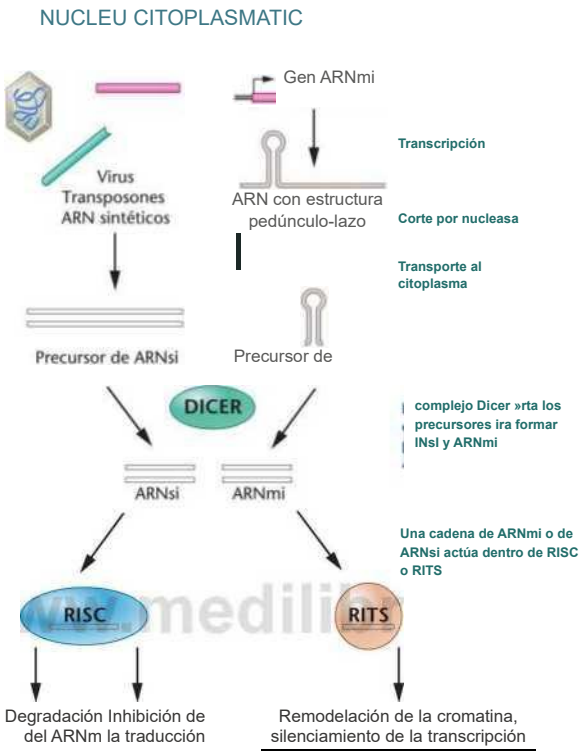


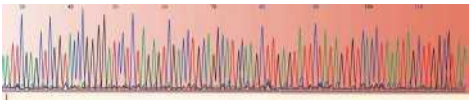
FIGURA 17.16 Mecanisme de reglare genică prin reducerea la tăcere a genelor indusă de ARN. Precursorii ARNsi sau miARN sunt procesați de complexul Dicer în citoplasmă pentru a produce molecule de ARN scurte , dublu catenare. Aceste molecule sunt apoi recunoscute de complexul RISC sau RITS, o catenă fiind degradată. În calea ARNi, complexul RISC , ghidat de ARN antisens monocatenar , recunoaște substraturile ARNm țintă , marcându-le pentru degradare sau pentru inhibarea translației . În calea de reducere la tăcere transcripțională , complexul RITS acționează în nucleu , recunoscând ADN-ul genomic care este complementar catenelor simple ale moleculelor miARN sau ARNsi. Complexul RITS recrutează proteine de remodelare a cromatinei care modifică cromatina și reprimă transcripția.

Pe lângă utilizarea sa în cercetarea de laborator , tehnologia ARNi este dezvoltată ca un potențial agent farmaceutic. În teorie, orice boală cauzată de supraexprimarea unei gene specifice sau chiar de exprimarea normală a unui produs genetic anormal, ar putea fi vizată folosind ARNi terapeutic. Infecțiile virale sunt una dintre țintele evidente, iar oamenii de știință au obținut rezultate promițătoare utilizând ARNi în culturi de țesuturi pentru a reduce severitatea infecției cu diferite tipuri de virusuri, cum ar fi HIV, gripa și poliomielita. În modelele animale, moleculele ARNi au tratat cu succes infecții virale , boli oculare, cancere și boli inflamatorii intestinale . În aceste studii, moleculele ARNi sintetice au fost aplicate pe suprafețele membranelor mucoase sau pe ochi , țesutul cerebral sau intestine . Cercetările privind medicamentele pe bază de ARNi au progresat rapid, iar etapele de fază I (toxicitate) ale primelor studii clinice umane au fost finalizate. Studiile clinice de fază II și fază III (eficacitate) au început să testeze utilizarea moleculelor siARN care vizează produsul genetic al factorului de creștere endotelial vascular ca medicament pentru tratarea degenerescenței maculare legate de

vârstă . De asemenea, au început studiile clinice pentru a testa tehnica ARNi în tratamentul infecțiilor cu hepatita B și virusul sincițial respirator. Sunt planificate studii clinice suplimentare - pentru utilizarea siARN în tratamentul infecțiilor cu virusul gripal și hepatita C, precum și al unor tumori solide.

Oamenii de știință sunt deosebit de entuziasmați de potențialele utilizări ale ARNi în diagnosticarea și tratamentul cancerului. Studiile recente arată că profilurile de expresie ale genelor miRNA sunt caracteristice fiecărui tip de tumoră. Această observație ar putea duce la metode mai precise pentru diagnosticarea tumorii, prezicerea dezvoltării tumorale și planificarea tratamentelor adecvate. În plus, anumite tipuri de cancer par să aibă defecte în expresia genelor miRNA . Tratarea acestor tumori cu molecule ARNsi sintetice ar putea corecta aceste defecte și inversa fenotipul canceros . În cele din urmă, unele tipuri de cancer sunt caracterizate prin supraexprimarea sau expresia anormală a uneia sau mai multor proto-oncogene cheie. Dacă metodele ARNi pot viza aceste produse genetice specifice, acestea ar putea ajuta la tratarea cancerelor care au devenit rezistente la alte metode, cum ar fi radiațiile sau chimioterapia.

Fiind un domeniu relativ nou, știința ARNi oferă mari perspective pentru medicina moleculară . Analiștii se așteaptă ca primele medicamente bazate pe ARNi să fie disponibile în următorul deceniu .



ȘI GENOMICĂ

Domeniu de studiu: Explorare genomică

În acest capitol, am discutat despre modul în care expresia genelor poate fi reglată în multe moduri complexe. Reamintim că un aspect al reglării genelor pe care l-am luat în considerare este modul în care secvențele promotoare, amplificatoare *și silențioase pot guverna inițierea* transcripțională a genelor pentru a permite exprimarea genelor specifice țesuturilor. Toate celulele și țesuturile dintr-un organism posedă același genom și multe gene sunt exprimate în toate tipurile de celule și țesuturi. Cu toate acestea, celulele musculare, celulele sanguine și toate celelalte tipuri de țesuturi exprimă gene care sunt în mare măsură specifice țesuturilor (adică nu sunt exprimate în alte tipuri de țesuturi sau expresia lor este limitată). În acest exercițiu , vom folosi BLAST pentru a afla mai multe despre modelele de expresie genică specifice țesuturilor.

■ **Exercițiul I. Rețeaua de știri despre genom**

În acest exercițiu, vom reveni la site-ul web al Centrului Național pentru Biotehnologie NCBI utilizează deja instrumentul de căutare BLAST , *Basic Local Alignment Search Tool,* pe care l -am prezentat în exercițiul din secțiunea „ Explorarea genomicii ” din Capitolul 10 .

1. **Accesați BLAST *de pe* site-ul NCBI la adresa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST .**
2. **Numerele de acces GenBank pentru patru gene diferite care prezintă modele de expresie specifice țesuturilor sunt furnizate mai jos . Va trebui să efectuați căutările folosind aceste gene.**

   NM.021 588.1 NM_00739.1
   AY260853.1
   NM-004917

3. **Pentru fiecare genă, efectuați o căutare BLAST de nucleotide folosind numărul de acces ca interogare de secvență . Consultați secțiunea „Explorarea genomicii ” din Capitolul 10 pentru a vă reîmprospăta memoria despre căutările BLAST . Deoarece numerele de acces sunt pentru secvențe de nucleotide, asigurați-vă că utilizați programul blast de nucleotide (blastn) atunci când *rulați* căutările. După ce introduceți „blastn” în categoria Alegeți setul de căutare , *ar* trebui să selectați baza de date *Altele (nretc.)* pentru a evita căutarea într-o bază de date specifică organismului.**
4. **Pentru primele rezultate corespunzătoare fiecărei gene, coloana *Linkuri* (extrema dreaptă) conține casete colorate etichetate U (date de expresie UniGene), E (profiluri de expresie genică) și G (informații despre genă). Fiecare dintre aceste casete oferă linkuri către informații despre genă. Linkul UniGene afișează un raport UniGene. Pentru unele gene, atunci când intrați în UniGene, este posibil să fie nevoie să faceți clic pe un link de deasupra numelui genei pentru a accesa un raport UniGene. Asigurați-vă că explorați linkul *Profil de expresie* din categoria *Expresie genică* din fiecare raport UniGene. Profilurile de expresie afișează un tabel** *(continuare)*

Explorare genomică (continuare)

a modelelor de expresie genică în diferite țesuturi.

linkul către *fișierele GEO pro* din categoria *Gene Expression* din rapoartele UniGene, dacă este disponibil . Aceste linkuri vă vor duce la o serie de studii privind expresia genelor legate de fiecare genă de interes. Explorați aceste resurse pentru fiecare genă *și* apoi răspundeți la următoarele întrebări:

a) Care este identitatea fiecărei secvențe, pe baza alinierii secvențelor? De unde știi?
b) Din ce specie a fost clonată fiecare genă?
c) Care țesut sau țesuturi sunt cunoscute ca exprimând fiecare genă?
d) Această genă prezintă o expresie reglată în diferite momente ale dezvoltării?
e) Care genă prezintă cel mai restricționat model de expresie , fiind exprimată în cele mai puține țesuturi?

STUDIU DE CAZ | Timpul este totul

SAU

Un bărbat de puțin peste treizeci de ani - dezvoltă brusc slăbiciune la nivelul mâinilor și gâtului , urmată câteva săptămâni mai târziu de dureri musculare de tip arsură - toate simptome ale distrofiei musculare cu debut tardiv. Internistul său solicită teste genetice pentru a determina dacă are una dintre distrofiile musculare moștenite , concentrându-se pe distrofia musculară Becker , distrofia miotonică de tip I și distrofia miotonică de tip II. Aceste teste sunt concepute pentru a detecta mutații în genele legate de distrofină *DMPK și ZNF9*. Testele exclud distrofia musculară Becker . În așteptarea rezultatelor testelor genetice pentru *DMPK și ZNF9,* Internistul îi explică pacientului că posibilele mutații se datorează extinderii repetițiilor de tri- și tetranucleotide, dar nu și porțiunilor genei care codifică proteinele . Medicul continuă spunând că tulburările rezultate nu se datorează modificărilor proteinelor codificate , care par a fi normale, ci mai degrabă unor modele modificate de splicing ale ARN-ului , în care resturile de splicing ale ARN-ului care conțin repetițiile nucleotidice interferează cu splicing -ul normal al transcrierilor de la alte gene . Aceste explicații ridică câteva întrebări interesante despre diagnosticul și baza genetică a tulburărilor.

1. Ce este splicing-ul alternativ, unde are loc și cum ar putea avea consecințe , dacă este afectat, asupra exprimării unei alte gene sau gene?
2. Ce rol ar putea juca repetițiile de tri- și tetranucleotide în mecanismul de splicing alternativ ?
3. Cum se compară aceasta cu alte tipuri de distrofie musculară, cum ar fi distrofia musculară Becker și distrofia musculară Duchenne ?

Puncte de rezumat

Pentru a vizualiza activități, animații și întrebări de recapitulare , consultați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

1. La organismele eucariote, reglarea genelor poate avea loc în oricare dintre etapele implicate în exprimarea genelor, de la rearanjările ADN-ului și modificarea cromatinei până la inițierea transcripției și procesarea post-transcripțională .
2. Rearanjamentele programate ale ADN-ului apar în anumite gene, în anumite tipuri de celule. Aceste rearanjamente sunt necesare pentru exprimarea normală și reglată a acelor gene.
3. Reglarea genelor eucariote la nivel de cromatină poate implica remodelarea cromatinei specifice genei, modificări ale histonei sau modificări ale ADN-ului .
4. Transcripția eucariotă este reglată de elemente promotoare, amplificatoare și amortizoare specifice genei .
5. Factorii de transcripție influențează ratele de transcripție prin legarea la situsurile de reglare cu acțiune *cis* situate în sau adiacent unui promotor genetic.
6. Se crede că factorii de transcripție acționează fie prin amplificarea , fie prin reprimarea asocierii factorilor generali de transcripție cu promotorul bazic. De asemenea , aceștia pot ajuta la remodelarea cromatinei .
7. - transcripțională include splicing alternativ al ARN-ului nascent , transportul ARN-ului sau modificări ale stabilității ARNm-ului .
8. Splicing-ul alternativ crește numărul de produse genetice codificate de aceeași genă .
9. transcripționale la nivelurile de traducere și stabilitate a proteinelor afectează, de asemenea, nivelurile produselor genice active .
10. Silențierea genică indusă de ARN este un mecanism post-transcripțional de reglare genică care afectează traductibilitatea și stabilitatea ARNm , precum și transcripția .

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Ca cercetător științific, imaginați-vă că ați decis să studiați reglarea transcripțională a unei gene al cărei ADN a fost clonat și secvențiat. Pentru a începe studiul, obțineți clona ADN a genei, care include gena și cel puțin 1 kb de ADN din amonte. Apoi creați o serie de subclone din acest ADN, fiecare conținând o deleție în regiunea din amonte a genei. Aceste șabloane de deleție sunt prezentate în figura următoare. Pentru a testa capacitatea acestor șabloane ADN de a direcționa transcripția genei, preparați două tipuri diferite de *sisteme de transcripție in vitro.* Primul este un sistem definit care conține ARN polimerază II purificată și factorii generali de transcripție purificați TFIID, TFIIB, TFIIE, TFIIF și TFIIH. Al doilea sistem constă dintr-un extract nuclear brut, care este fabricat prin îndepărtarea majorității proteinelor din nucleul celulelor cultivate. Testarea celor două sisteme de transcripție cu fiecare șablon produce următoarele rezultate:

Șablon nești ^+1 , transcfl sau ARN

4 IIMI —I

Matrițe șterse
-127 -81 -50 -11 +1

■a d b -127

-81

ZZ Regiunea n. stearsă. Regiunea rămasă

ADN adăugat extract nuclear Sistem purificat

< b -ii

Neselectat	++++	+
Ștergere -127	+ 4- ++	+
Ștergere -81	+ + + +	+
Ștergere -50	+	+
Ștergere -1 1	SAU	SAU

\+ Eficiență scăzută a transcripției + + + + Eficiență ridicată a transcripției sau nicio transcripție

(a) De ce nu există transcriere din șablonul cu lecția 11 atât în extractul brut, cât și în sistemul purificat?
(b) De ce diferă rezultatele pentru extractul nuclear și sistemul purificat în cazul mucegaiului *nești ?* Cum ați interpreta acest rezultat?
(c) Pentru fiecare dintre diferitele matrițe de deleție, comparați rezultatele obținute atât cu sistemul bazat pe extract nuclear, cât și cu sistemul purificat.
(d) Ce ne spun aceste date despre reglarea transcripției acestei gene?

Soluție:

(a) Lipsa transcripției din șablonul -11 sugerează că unele secvențe esențiale de ADN lipsesc din acest șablon de deleție . Deoarece șablonul -50 prezintă un anumit nivel de transcripție atât pentru extractul brut , cât și pentru sistemul purificat, este probabil ca secvențele esențiale lipsă, cel puțin la nivelurile bazale de transcripție, să se situeze între -50 și -11. Deoarece cutia TATA este situată în această regiune, absența sa din șablonul -11 poate fi motivul lipsei transcrierii .
(b) Șablonul nești , care conține cantități mari de ADN în amonte , este suficient pentru a promova niveluri ridicate de transcripție într-un extract nuclear, dar numai niveluri scăzute într- un sistem purificat. Aceste date sugerează că lipsește ceva în sistemul purificat în comparație cu extractul nuclear și că această componentă lipsă este importantă pentru obținerea unor niveluri ridicate de transcripție de la acest promotor . Întrucât compoziția acestor extracte nucleare brute nu este definită, din datele furnizate nu este clar care factori ai extractului sunt esențiali.
(c) șabloanele -127, cât și -81 se comportă similar cu șablonul nești, atât în extractul nuclear, cât și în sistemele purificate — producând niveluri ridicate de transcripție cu extractele nucleare, dar niveluri scăzute în sistemul purificat . În schimb , șablonul -50 prezintă doar niveluri scăzute de transcripție în ambele sisteme . Aceste rezultate indică faptul că toate secvențele necesare pentru a obține niveluri ridicate de transcripție într- un sistem brut sunt situate între -81 și -50 .
(d) În primul rând , aceste date ne spun că factorii generali de transcripție singuri sunt suficienți pentru a specifica o eficiență ridicată a transcripției de la acest promotor . Elementele secvenței de ADN prin care funcționează factorii generali de transcripție sunt situate la o distanță maximă de 50 de perechi de baze față de situsul de inițiere a transcripției . În al doilea rând , datele ne spun că promotorul acestei gene este probabil un membru al clasei de promotori „centrați" cu un situs de inițiere a transcripției definit și o cutie TATA esențială . În al treilea rând , nivelurile ridicate de transcripție necesită secvențe situate între -81 și -50 de perechi de baze față de situsul de inițiere a transcripției . Aceste secvențe interacționează cu una sau mai multe componente ale extractelor nucleare brute .

2. Oamenii de știință estimează că peste 15 % dintre mutațiile care cauzează boli implică erori în mecanismele alternative de splicing . Cu toate acestea , există un caz interesant în care o deleție a unui exon pare să crească producția de distrofină în celulele musculare ale pacienților cu distrofie musculară Duchenne (DMD). O deleție a exonului 45 al genei *distrofinei* este mutația care cauzează cel mai frecvent DMD. Însă unele persoane cu distrofie musculară Becker (BMD), o formă mai puțin severă de distrofie musculară , au deleții ale exonilor 45 și 45 .

(continuă)

Idei și soluții (continuare)

și 46 (van Deutekom și van Ommen, 2003. *Nat. Rev. Genetics* 4: 774-783). Oferiți o posibilă explicație pentru motivul pentru care pacienții cu DMO , cu o deleție atât în exonul 45, cât și în cel 46, produc mai multă distrofină decât pacienții cu DMD .

Soluție. O deleție într- un exon are mai multe efecte posibile asupra unui produs genetic. O posibilitate este ca ARNm-ul transcris din gena *distrofinei* cu exonul deletat să fie instabil, ceea ce duce la lipsa producției de proteine distrofine. Chiar dacă ARNm-ul este stabil, proteina distrofină mutată rezultată ar putea suferi o degradare rapidă, ducând la absența unei proteine active stabile. O altă posibilitate este ca deleția exonului să creeze o mutație de schimbare de fază, care la rândul ei introduce un codon stop prematur al translației . Deoarece gena distrofinei are 79 de exoni care acoperă peste 2,6 milioane de perechi de baze de ADN, o mutație de schimbare de fază în exonul 45 ar putea crea un codon stop aproximativ la jumătatea genei. ARNm -ul transcris din această genă ar fi supus unei degradări a ARNm-ului mediate de proteine nonsens , datorită prezenței codonului stop prematur. Orice ARNm care scapă degradării ar codifica o proteină distrofină mai scurtă decât cea normală , care ar fi probabil degradată rapid .

Este posibil ca o deleție care cuprinde ambii exoni 45 și 46 să poată restabili cadrul de citire al proteinei distrofină în exonul 47. Produsul proteic al acestei gene nu ar avea secvențe de aminoacizi codificate de cei doi exoni lipsă; cu toate acestea , proteina în sine ar putea avea în continuare o oarecare activitate, restabilind parțial fenotipul de tip sălbatic .

Așa cum este descris în articolul lui van Deutekom și van Ommen, aproximativ 60 % din toate mutațiile DMD implică deleții la un singur exon . O strategie luată în considerare pentru terapia genică DMD implică restabilirea cadrului de citire normal prin omiterea altor exoni în timpul splicingului pre -ARNm. Dacă are succes , acest tip de terapie ar putea converti un fenotip DMD sever într- o formă mai puțin severă a bolii, similară cu DMO.

Problemas y preguntas para la discusión

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

DE UNDE ȘTIM «

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care genele eucariote sunt reglate în diferite etape ale expresiei lor , de la modificările cromatinei până la controlul stabilității proteinelor . Pe parcursul acestui proces, am avut numeroase ocazii să analizăm metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) De unde știm că secvențele promotoare și amplificatoare controlează inițierea transcripției în organismele eucariote?
   (b) De unde știm că factorii de transcripție eucarioți se leagă de secvențe de ADN situate în sau în apropierea regiunilor promotoare ?
   (c) De unde știm că moleculele de ARN bicatenar pot controla expresia genelor?
2. De ce este reglarea genelor mai complexă într-un organism eucariot multicelular decât într-un organism procariot? De ce este studierea acestui fenomen mai dificilă la organismele eucariote ?
3. Enumerați și definiți nivelurile de reglare genică discutate în acest capitol.
4. Oferiți o definiție a mecanismului de remodelare a cromatinei și dați două exemple ale acestui fenomen.
5. Descrieți organizarea nucleului interfazic. Includeți în prezentarea dvs. o descriere a teritoriilor cromozomiale, a compartimentelor cromozomiale și a fabricilor de transcripție . Explicați cum tehnicile de pictare a cromozomilor au ajutat la dezvăluirea organizării nucleului interfazic .
6. O serie de experimente au arătat că anumite zone ale genomului care sunt relativ inerte din punct de vedere transcripțional sunt rezistente la digestia cu DNaza I; cu toate acestea, zonele care sunt active din punct de vedere transcripțional sunt sensibile la DNaza I. Descrieți cum rezistența sau sensibilitatea la DNaza I ar putea indica activitate transcripțională.
7. Oferiți o scurtă descriere a două tipuri diferite de modificări ale histonelor.
8. Oferiți un rezumat al modului în care poate fi remodelată cromatina . Descrieți cum influențează aceste procese de remodelare transcripția.
9. elementele de reglare a activării *cis* numite promotori și amplificatori.
10. necesară și suficientă legarea unui factor de transcripție la secvența sa de recunoaștere a ADN- ului pentru inițierea transcripției într-o genă reglată? Ce altceva joacă un rol în acest proces?
11. controlul reglării genelor la organismele eucariote și procariote la nivelul inițierii transcripției . Cum funcționează mecanismele de reglare? Care sunt asemănările și diferențele dintre aceste două tipuri de organisme, în ceea ce privește componentele specifice ale mecanismelor de reglare? Indicați cum se leagă aceste diferențe sau asemănări de contextul biologic al controlului expresiei genelor.
12. Multe regiuni promotoare conțin cutii CAAT, care au secvențe consens CAAT sau CCAAT la aproximativ 70 până la 80 de baze în amonte de situsul de inițiere a transcripției . Cum ar putea fi determinată influența cutiilor CAAT asupra ratei de transcripție a unei anumite gene ?
13. Cercetări recente indică faptul că promotorii pot fi clasificați în două tipuri: *concentrați* sau *dispersați*. Prin ce diferă aceștia?

Aceste tipuri de promotori și ce gene tind să fie asociate cu fiecare dintre ei?

14. Oferiți o prezentare generală a reducerii la tăcere a genelor induse de ARN , obținută prin interferență ARN (ARNi) și microARN (miARN). Cum încep procesele de reducere la tăcere și care sunt principalele componente implicate ?
15. Cum contribuie diversitatea răspunsului imun la imprecizia inerentă a evenimentelor de recombinare în timpul rearanjării genei imunoglobulinelor ?
16. Explicați caracteristicile structurale ale elementelor Inițiator (Inr), BRE, DPE și MTE ale promotorilor centrați .
17. Superînrăsucirea ADN-ului, care apare atunci când tensiunea de înrăsucire este generată înaintea furcii de replicare , este atenuată de ADN giraza. Superînrăsucirea poate fi , de asemenea, implicată în reglarea transcripției . Cercetătorii au descoperit că amplificatorii transcripționali care operează la distanțe lungi (2500 de perechi de baze) sunt dependenți de superînrăsucirea ADN-ului , în timp ce amplificatorii care operează la distanțe mai scurte (110 perechi de baze) nu sunt la fel de dependenți (Liu et al., 2001. *Proc. Nati. Acad. Sci.* [SUA] 98: 14883-14888). Folosind o diagramă , sugerați o modalitate prin care superînrăsucirea ar putea influența pozitiv activitatea amplificatorilor la distanță lungă .
18. La unele organisme, inclusiv la mamifere, există o relație inversă între prezența 5-metilcitozinei (m5C) în secvențele CpG și activitatea genelor. În plus, m5C poate fi implicat în recrutarea proteinelor care determină tranziția regiunilor cromatinei de la o stare activă transcripțional la o stare inertă. În general, ADN-ul genomic este relativ sărac în secvențe CpG din cauza conversiei m5C în timină ; cu toate acestea , insulele CpG nemetilate sunt adesea asociate cu gene active . Cercetătorii au stabilit că modelele de metilare a ADN-ului în spermă variază în funcție de vârstă la șobolani și sugerează că astfel de modificări legate de vârstă ale metilării ADN -ului sunt adesea unul dintre mecanismele care stau la baza anomaliilor legate de vârstă la mamifere (Oakes et al., 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 1775-1780). Având în vedere informațiile de mai sus, oferiți o explicație care leagă modificările paterne ale metilării ADN-ului asociate cu vârsta de anomalii congenitale .
19. Într-un ipotetic organism extraterestru, genele imunoglobulinelor Quagarre suferă rearanjări similare cu cele de la oameni , cu două diferențe principale. O diferență este că regiunile V ale genei κ Regiunile lanțului ușor sunt situate pe cromozomul 4, în timp ce celelalte regiuni ale genei κ Genele lanțului ușor sunt situate pe cromozomul 10. O altă diferență este că genele imunoglobulinei Quagarre nu se rearanjează până când creatura nu împlinește 13 ani . Examinând distribuția cromozomilor mitotici ai unei celule B Quagarre , cum ați putea estima vârsta creaturii ?

Probleme suplimentare picante

20. Deoarece gradul de metilare a ADN-ului pare a fi un marker genetic relativ fiabil pentru unele forme de cancer, cercetătorii au explorat posibilitatea modificării metilării ADN-ului ca formă de terapie împotriva cancerului . Studiile inițiale indică faptul că, în timp ce hipermetilarea suprimă formarea unor tumori, alte tumori par să prospere. De ce ne-am putea aștepta ca diferite tipuri de cancer să răspundă diferit la terapiile de hipometilare sau hipermetilare ?
21. Explicați cum ar afecta următoarele mutații transcripția genei *GALI de* drojdie .
    (a) O deleție în cadrul genei *GAL4* care elimină regiunea care codifică aminoacizii ia 100.
    (b) O deleție a întregii gene *GAL3* .
    (c) O mutație a genei GAL80 *care* blochează capacitatea proteinei Gal80 de a interacționa cu Gal3p .
    (d) O deleție a unuia dintre cele patru elemente UAS G situate în amonte de *gena GALI.*
    (e) O mutație punctuală în promotorul *GALI* de bază care modifică secvența TATA box .
22. Nucleul interfazic pare a fi o organită extrem de structurată, cu teritorii cromozomiale, compartimente intercromozomiale și fabrici de transcripție. În culturile de celule umane , cercetătorii au identificat aproximativ 8.000 de fabrici de transcripție per celulă, fiecare conținând în medie opt molecule de ARN polimerază II strâns asociate, care transcriu activ ARN. Dacă fiecare moleculă de ARN polimerază II transcrie o genă distinctă , cum ar arăta o astfel de fabrică de transcripție? Furnizați o diagramă simplă care să arate opt gene distincte transcrise într-o singură fabrică de transcripție și includeți...

    Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

    în prezentarea sa, promotorii, genele structurale și transcrierile nascente .
23. Un anumit tip de anemie la om, numită β3-talasemie, rezultă dintr-o reducere severă sau absență a unui lanț *α3 normal* al hemoglobinei. Mai multe studii au explorat utilizarea 5-azacitidinei pentru tratamentul acestor pacienți. De ce ar putea fi administrarea de 5-azacitidinei un tratament eficient pentru β3- talasemie? Credeți că ar fi probabile efecte secundare adverse? De ce?
24. Adăugarea unui capac 5' și a unei cozi poli-A 3' la multe tipuri de ARN nuclear are loc înainte de exportul ARNm maturi în citoplasmă . Astfel de modificări par să influențeze stabilitatea ARNm. Multe teste privind - reglarea genelor implică utilizarea unor gene indicator, cum ar fi luciferaza, extrasă din licuriciul nord-american *(Photinus pyralis).* Când gena luciferazei este transcrisă și tradusă , produsul proteic poate fi ușor detectat într-o eprubetă . În prezența luciferinei, ATP și oxigenului, enzima luciferază produce lumină care poate fi ușor cuantificată. Presupunând că am putea obține ARNm de luciferază și să-l modificăm diferențial (prin adăugarea unui capac 5' și a unei cozi poli-A) într-o eprubetă, sugerăm un sistem de teste care ne-ar permite să determinăm influența pe care adăugarea capacului 5' și a cozii poli-A o are asupra stabilității ARNm.
25. Metilarea ADN-ului este frecvent asociată cu o transcripție redusă . Următoarele date provin dintr -un studiu privind impactul localizării și extinderii metilării ADN-ului asupra activității genelor în celulele umane . O genă bacteriană, luciferază, a fost clonată alături de fragmente de promotori eucarioți care au fost metilați la

Diverse măsurători au fost utilizate *in vitro.* Plasmidele himerice au fost apoi introduse în celulele tisulare cultivate și a fost măsurată activitatea luciferazei. Aceste date compară gradul de exprimare a luciferazei cu diferențele în localizarea metilării ADN-ului (Irvine și colab., 2002. *Mol. și Cell. Biol. 22:* 6689-6696). Ce concluzii generale se pot trage din aceste date?

26 Mulți oameni de știință consideră transportul nuclear selectiv al ARN-ului

Segmento de ADN	Tamaño del fragmento metilado (kb)	Número de CpG mediados	Expresión relativa de la luciferasa
Unidad de transcripción externa	0,0	0	490X
	2,0	100	290X
(a una distancia de 0-7,6 kb)	3,1	102	250X
	12,1	593	2X
Unidad de transcripción interna	0,0	0	490X
	1,9	108	80X
	2,4	134	5X
	12,1	593	2X

ca o formă de reglare genică la organismele eucariote . Descoperirea a ceea ce pare a fi un set de elemente nucleare fibroase susține această ipoteză. Într-o analiză recentă a literaturii de specialitate pe această temă (Pederson, 2000. *Molecular Biology of the Cell* 11: 799-805), autorul a raportat date din mai multe experimente de marcare concepute pentru a determina dacă reglarea genică la organismele eucariote este legată de sortarea nucleară a pre- ARNm-urilor . Marea majoritate a rezultatelor au indicat faptul că ARN-ul poli-A se deplasează prin difuzie. Ce influență ar avea aceste rezultate asupra modelelor care leagă reglarea genică de transportul ARN-ului nuclear ?

27. La șoareci , o mutație recesivă de dismielinizare (qk *)* provoacă tremor; această mutație pare să implice defecte în mecanismul alternativ de splicing al unei proteine de transducție a semnalului care a fost conservată evolutiv . Indivizii homozigoți *(qk/qk)* experimentează tremor în timpul exercițiilor fizice. Șoarecii maturi pot înșela și nu se pot mișca timp de câteva secunde. Figura de mai jos prezintă modelele de splicing ale diferitelor genotipuri de șoareci tremurători și normali. Figura prezintă porțiuni de ARN (inclusiv exonii 11, 12 și 13) de MAG (-glicoproteină asociată mielinei) din creierul șoarecilor tineri (14 zile) și adulți (2 luni) . Concentrația relativă a fiecărui ARN este indicată în diagrama gelului de mai jos (figura și datele sunt modificate după Wu, J., et al. 2002. *Proc. Nati. Acad. Sci. 99:* 4233-4238). Având în vedere aceste informații, descrieți modelele alternative de splicing, indicând exonii incluși / exclusi în funcție de vârstă și genotip .

A = *+/qk* tânăr B = *qk/qk* tânăr C = *+/qk* adult D = *qk/qk* adult

12^13-AAAA...

lli, 12, 13

uns

28. ARN-urile care au fost tăiate și îmbinate necorespunzător duc adesea la dezvoltarea de boli la om . Oamenii de știință au examinat celulele canceroase umane pentru modificări specifice ale mecanismelor de îmbinare și au descoperit că multe dintre aceste modificări afectează negativ funcția genelor supresoare tumorale (Xu și Lee, 2003. *Nuci. Acids Res.* 31: 5635-5643). În general , care ar fi efectele modificărilor mecanismelor de îmbinare asupra acestor ARN-uri și asupra funcției genelor supresoare tumorale? Cum ar putea fi asociată pierderea specificității în îmbinare cu cancerul ?
29. În analiza genetică clasică, oamenii de știință creează mutații în interiorul sau în apropierea secvențelor genetice donate. Apoi introduc aceste secvențe genetice mutate în culturi celulare sau organisme model și examinează fenotipurile . Geneticienii adaugă acum mecanisme de reducere a tăcerii genetice induse de ARN la arsenalul lor de instrumente de analiză genetică. Descrieți cum am putea utiliza reducerea tăcerii genetice *indusă* de ARN pentru a studia rolul genei Drosophila tra în determinarea *sexului* . Apoi , descrieți cum ați studia funcția genei *tra* folosind analiza genetică clasică. Care sunt avantajele și limitele fiecărei tehnici de cercetare ?
30. În timpul unei examinări a secvențelor genomice care înconjoară gena β3-globinei umane, am descoperit o regiune de ADN care are o oarecare similaritate de secvență cu GRE (elementul de răspuns la glucocorticoizi) al genei metalotioneinei HA umane (hMTIIA) . Descrieți experimentele pe care le-ați efectua pentru a testa (1) dacă această secvență este necesară pentru exprimarea corectă și precisă a genei β1-globinei și (2) dacă această secvență funcționează în același mod ca GRE al *genei hMTIIA.*

8

Această specie rară *de Drosophila* cu patru aripi a dezvoltat o pereche suplimentară de aripi ca urmare a unei mutații a unei gene selectoare homeotice.

Genetica dezvoltării

CONCEPTE CAPITOL

►► **Acțiunea genelor în dezvoltare se bazează pe transcripția diferențială a genelor selectate.**

►► **Animalele folosesc un număr mic de sisteme de semnalizare și rețele de reglare pentru a construi formele adulte ale organismului din zigot. Aceste proprietăți comune fac posibilă utilizarea modelelor animale pentru studierea dezvoltării la oameni .**

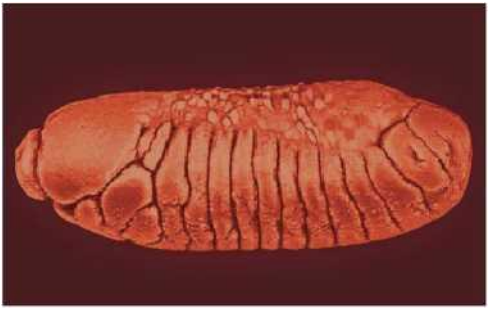
►► **Diferențierea este controlată de cascade de acțiune genică care urmează specificarea și determinarea stabilite de soarta dezvoltării.**

Plantele au evoluat independent prin mecanisme de dezvoltare , în paralel cu cele ale animalelor.

►► În multe organisme, semnalele celulă-celulă programează calea de dezvoltare a celulelor adiacente și a celor îndepărtate .

În ultimele două decenii, analiza genomică și biologia moleculară au arătat că, în ciuda enormei diversități de dimensiuni și forme a stării adulte, toate organismele multicelulare au în comun numeroase gene și rutas genéticas y mecanismos de señalización molecular en procesele de dezvoltare care le duc de la zigot la adult. La nivel celular, dezvoltarea este marcată de trei evenimente importante: specificarea, prin care o serie de indicii genetice și poziționale conferă celulelor o identitate spațială discretă; determinarea, momentul în care soarta specifică de dezvoltare a unei celule este fixată; și diferențierea, procesul prin care o celulă își atinge forma și funcția finală. În plus, genomica comparativă a arătat că organismele superioare au în comun numeroase relații evolutive și de dezvoltare. Analiza genetică a identificat numeroase gene de reglare care controlează rețelele de gene structurale implicate în procesele de dezvoltare, iar acum începem să înțelegem modul în care acțiunea și interacțiunea acestor gene controlează procesele de dezvoltare de bază la eucariote.

În acest capitol, accentul principal va fi pus pe modul în care genetica a fost utilizată pentru studierea dezvoltării. Acest domeniu, numit genetica dezvoltării, a contribuit enorm la înțelegerea proceselor de dezvoltare, deoarece informațiile genetice sunt necesare pentru funcțiile moleculare și celulare implicate în evenimentele de dezvoltare și contribuie la fenotipul în continuă schimbare al organismelor nou formate.



(a)

(b)

FIGURA 18.1 (a) Embrión de *Drosophila y* (b) mosca adulta que se desarrolla a partir del embrión.

18.1

Stările diferențiate
Se dezvoltă din programe coordonate de expresie genică

Genomurile animale conțin zeci de mii de gene, dar doar un mic subset al acestora controlează evenimentele care modelează corpul adult. (Figura 18.1).

Geneticienii dezvoltării studiază alelele mutante ale acestor gene pentru a ridica întrebări importante despre dezvoltare:

- Ce gene sunt exprimate?
- Când se exprimă ei?
- În ce părți ale embrionului în curs de dezvoltare sunt exprimate?
- Cum este reglată expresia acestor gene?
- Ce se întâmplă când aceste gene sunt defecte?

Aceste întrebări stau la baza explorării fundamentelor moleculare ale proceselor de dezvoltare, cum ar fi determinarea, inducerea, comunicarea intercelulă și diferențierea celulară. Analiza genetică a alelelor mutante este utilizată pentru a stabili o relație cauzală între prezența sau absența inductorilor, receptorilor, evenimentelor transcripționale și interacțiunilor celulă-țesut și evenimentele morfologice observabile care însoțesc dezvoltarea.

O modalitate utilă de a defini dezvoltarea este de a spune că aceasta reprezintă *atingerea unei stări diferențiate* de către toate celulele unui organism (cu excepția celulelor stem). De exemplu, o celulă dintr-un embrion în stadiul de blastulă (când embrionul este o sferă de celule cu aspect uniform) este nediferențiată , în timp ce o celulă roșie din sânge, care sintetizează hemoglobina la adult, este diferențiată. Cum trec celulele de la o stare nediferențiată la una diferențiată? Procesul implică activarea progresivă a diferitelor grupuri de gene în diferite celule ale embrionului. Dintr-o - perspectivă genetică, o modalitate de a defini seria de tipuri distincte de celule care se formează în timpul dezvoltării unui organism multicelular este de a identifica și cataloga genele care sunt active în fiecare tip de celulă. Cu alte cuvinte, dezvoltarea depinde de modele de exprimare genică diferențială.

Ideea conform căreia diferențierea se realizează prin activarea și dezactivarea genelor în momente diferite și în diferite tipuri de celule se numește ipoteza activității genice variabile . Presupunerile de bază sunt, în primul rând, că fiecare celulă conține un genom complet și, în al doilea rând, că transcripția diferențială a genelor selectate controlează dezvoltarea și diferențierea fiecărei celule. La organismele multicelulare, evoluția a conservat genele implicate în dezvoltare, modelele de transcripție diferențială și mecanismele de dezvoltare rezultate. Drept urmare, oamenii de știință au putut afla despre dezvoltarea organismelor multicelulare în general, prin disecția acestor mecanisme într-un număr mic de organisme model bine caracterizate genetic.

18.2

Conservarea evolutivă a mecanismelor de dezvoltare poate fi studiată folosind organisme model

Analiza genetică a dezvoltării la o mare varietate de organisme a arătat că toate animalele utilizează un set comun de mecanisme de dezvoltare și sisteme de semnalizare . De exemplu , multe dintre diferențele de mărime și formă dintre zebre și peștele zebră sunt controlate de modele distincte de expresie ale unui singur grup de gene numite gene homeotice , mai degrabă decât de expresia multor gene diferite împrăștiate în tot genomul. Proiectele de secvențiere a genomului au confirmat că genele unei game largi de organisme sunt în mare parte conservate la nivel de secvență de ADN . Această omologie a genelor și a mecanismelor de reglare înseamnă că multe aspecte ale dezvoltării embrionare umane normale și ale tulburărilor genetice asociate pot fi studiate folosind organisme model, cum ar fi *Drosophila,* care, spre deosebire de oameni, pot fi manipulate genetic *(vezi* Capitolul 1 pentru o explicație a organismelor model în genetică).

Deși multe mecanisme de dezvoltare sunt similare la toate animalele, selecția a condus, de asemenea, la căi noi și diferite pentru transformarea zigoților în organisme adulte. Mai multe mecanisme genetice stau la baza acestor schimbări evolutive, inclusiv mutația , divergența și duplicarea genelor, atribuirea de noi funcții genelor vechi și recrutarea de gene pe noi căi de dezvoltare . Cu toate acestea , în acest capitol, ne vom concentra asupra asemănărilor care există între specii.

Analiza mecanismelor de dezvoltare

În acest capitol, nu putem trece în revistă fiecare aspect al dezvoltării și nici nu putem explora analiza genetică a tuturor mecanismelor de dezvoltare puse în mișcare prin fuziunea spermatozoidului cu ovulul. În schimb, ne vom concentra asupra câtorva procese generale de dezvoltare:

- Cum structura corpului adult al animalelor este deja specificată în embrion.
- Programul de expresie genică ce transformă celulele nediferențiate în celule diferențiate.
- Rolul pe care îl joacă comunicarea intercelulă în dezvoltare.

Vom folosi trei sisteme model - *Drosophila melanogaster, Arabidopsis thaliana* și *Caenorhabditis elegans* - pentru a ilustra aceste procese de dezvoltare și problemele conexe . Vom examina rolul expresiei genetice diferențiale în restricționarea progresivă a opțiunilor de dezvoltare care duce la formarea structurii corporale adulte la organismele model *Drosophila și Arabidopsis.* Apoi vom extinde discuția pentru a include selecția căilor care dau naștere celulelor diferențiate la plante și animale și pentru a lua în considerare rolul comunicării intercelulă în *dezvoltarea C. elegans.*

18.3

Analiza genetică a dezvoltării embrionare a *Drosophilei* dezvăluie modul în care este specificată axa corpului animalului

O întrebare centrală în biologia dezvoltării este de ce anumite celule activează sau dezactivează gene specifice în anumite momente ale dezvoltării. Studierea organismelor model oferă informații despre identitatea genelor reglatoare și a rețelelor pe care acestea le controlează în timpul dezvoltării. În special, analiza genetică și moleculară a dezvoltării embrionare la *Drosophila* evidențiază rolul cheie al componentelor moleculare citoplasmatice ale ovocitelor în controlul expresiei genelor .

Aspecte generale ale dezvoltării de *Drosophila*

Dezvoltarea Drosophilei Tranziția de la zigot la adult durează aproximativ zece zile și include mai multe faze distincte : embrionul, trei stadii larvare, stadiul de pupă și stadiul de adult (Figura 18.2). Intern, citoplasma ovulului fertilizat este organizată într- o serie de gradienți moleculari de origine maternă, care îndeplinesc diverse funcții.

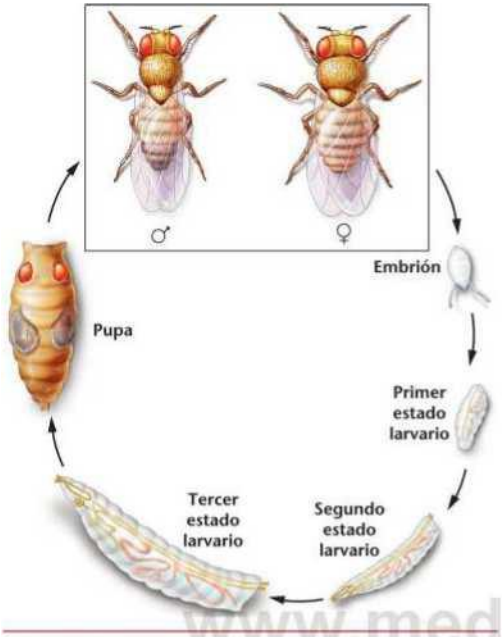


FIGURA 18.2 Ciclo biológico de *Drosophila*.

cheie în determinarea destinului dezvoltării nucleilor situati în regiuni specifice ale embrionului.

Imediat după fertilizare, nucleul zigotului trece printr-o serie de diviziuni nucleare fără citokineză [Figura 18.3(a) și (b)], formând blastodermul sincițial (un sincițiu este orice celulă cu mai mult de un nucleu). După aproximativ a zecea diviziune, nucleii migrează spre periferia ovulului în citoplasmă, care conține gradienți localizați de proteine și transcrieri de ARNm derivate matern [Figura 18.3(c)]. După încă câteva diviziuni, nucleii devin închiși în membranele plasmatice [Figura 18.3(d)] și formează celule.

Celulele care se formează la polul posterior al embrionului [Figura 18.3(c) și (d)] devin celule germinale. Dacă nucleii din alte regiuni ale embrionului sunt transplantați în citoplasma posterioară, se vor forma celule germinale, confirmând că citoplasma din această regiune conține componente materne care direcționează nucleii să formeze celule germinale.

Programele transcripționale inițiate în nucleele celulelor non-germinale formează axele de simetrie anteroposterior (cap-coadă) și dorsoventral (spate-față), ducând la formarea unui embrion segmentat [Figura 18.3(e)]. Într-un stadiu ulterior de dezvoltare, aceste segmente dau naștere structurilor diferențiate ale musculiței adulte [Figura 18.3(f)] , *sub* controlul genei Hox . (despre care vom discuta într-o secțiune ulterioară).

Analiza genetică a embriogenezei

Două seturi diferite de gene controlează dezvoltarea embrionară la Drosophila , Genele cu efect matern și genele zigotice (Figura 18.4). În timpul dezvoltării ovulului , produsele genelor cu efect matern (ARNm și proteine) sunt depuse în citoplasma ovulului . Multe dintre aceste produse sunt distribuite într-un gradient sau concentrate în regiuni specifice ale ovulului . Femelele homozigote pentru anumite mutații recesive ale genelor cu efect matern sunt sterile, deoarece niciunul dintre embrionii lor nu va primi produse genetice de tip sălbatic de la mamă și, prin urmare, nu se vor dezvolta normal. Genele cu efect matern codifică factorii de transcripție și proteinele care reglează expresia genelor . În anumite etape ale dezvoltării embrionare, aceste produse genetice activează sau reprimă expresia genomului zigotului într-o secvență temporală și spațială.

Genele zigotice sunt transcrise în nucleul embrionului în curs de dezvoltare. Mușteleu cu anumite mutații homozigote în genele zigotice prezintă letalitate embrionară. Într -o încrucișare între două muște heterozigote pentru o mutație zigotică recesivă, un sfert dintre embrioni (homozigoții recesivi) nu se vor dezvolta normal și vor muri. La *Drosophila,* multe gene zigotice sunt transcrise în regiuni specifice ale embrionului ca răspuns la distribuția proteinelor cu efect matern .

O mare parte din ceea ce se știe despre genele care reglează - dezvoltarea la *Drosophila* Se bazează pe munca lui Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus și Ed Lewis, care au primit Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 1995. Ed Lewis a identificat și studiat inițial unele dintre aceste gene reglatoare în anii 1970. Mai târziu , în acel deceniu , Nüsslein-Volhard și Wieschaus au dezvoltat o strategie de screening pentru a identifica toate genele care controlează dezvoltarea la Drosophila . Metoda lor a necesitat examinarea a mii de urmași ai mușteloor mutante , căutând mutații letale recesive embrionare cu defecte fenotipice în segmentele corpului și alte structuri externe. Prin urmare, părinții au fost identificați ca purtători heterozigoți ai acestor mutații , pe care cercetătorii le-au grupat în trei clase: gene gap , *gene even- rule.* și *polaritatea segmentelor.* În 1980, pe baza observațiilor lor, Nüsslein-Volhard și Wieschaus au propus un model în care dezvoltarea

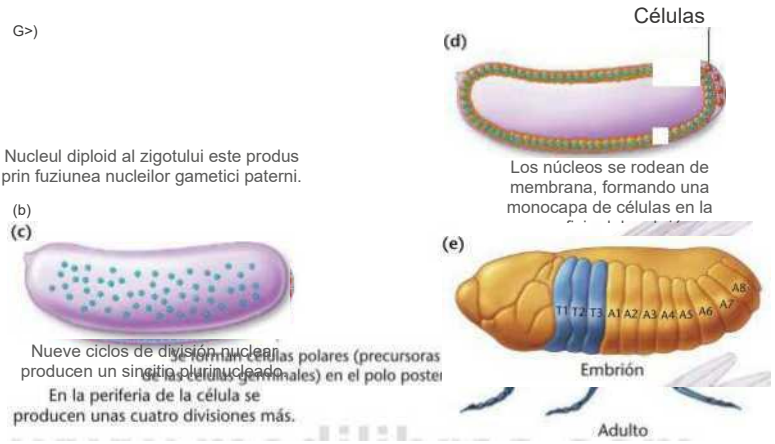

G>)
Células
(d)
Nucleul diploid al zigotului este produs prin fuziunea nucleilor gametici paterni.
Los núcleos se rodean de membrana, formando una monocapa de células en la
(b)
(c)
(e)
T1 T2 T3 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8
Nueve ciclos de división nuclear producen un sincitio plurinucleado.
En la periferia de la célula se producen unas cuatro divisiones más.
Embrión
Adulto

FIGURA 18.3 Etapele incipiente ale dezvoltării embrionare la *Drosophila,* (a) Ovul fecundat cu nucleul zigotic (2 săptămâni), la scurt timp după fertilizare, (b) Diviziunile nucleare au loc aproximativ la fiecare 10 minute. Nouă cicluri de diviziune produc o celulă multinucleată, blastodermul sincițial. (c) La a zecea diviziune, nucleii migrează către suprafața exterioară sau cortexul ovulului, iar la suprafață au loc încă patru cicluri de diviziune nucleară. La aproximativ două ore și jumătate după fertilizare, la polul posterior se formează un mic grup de celule, celulele polare. Aceste celule vor forma celulele germinale ale adultului. (d) La aproximativ trei ore după fertilizare, nucleii sunt înconjurați de o membrană, formând un monostrat de celule la suprafața embrionului, dând naștere blastodermului celular. (e) Embrionul la aproximativ 10 ore după fertilizare. În această etapă, modelul de segmentare a corpului este deja clar stabilit. Pe lângă segmentele care vor forma capul, TI-T3 sunt segmente toracice, iar A1-AS sunt segmente abdominale. (f) Musca adultă care prezintă structurile formate din fiecare segment embrionar.

Dezvoltarea embrionară este inițiată de gradienți ai produselor genelor cu efect matern . Informațiile poziționale stabilite de acești gradienți moleculari sunt interpretate prin exprimarea a două grupuri de gene zigotice: (1) gene de segmentare (gene gap, gene ale regulii perechilor și gene ale polarității segmentului) și (2) gene cititoare homeotice . Acțiunea genelor de segmentare împarte embrionul într-o serie de benzi sau segmente care definesc numărul, dimensiunea și polaritatea fiecărui segment. Genele homeotice identifică identitatea fiecărui segment și structurile adulte formate din segmente (Figura 18.4).

Modelul dezvoltat de Nüsslein-Volhard și Wieschaus este prezentat în Figura 18.5. Majoritatea produselor genice ale efectului matern localizate în ovul în timpul ovogenezei sunt activate imediat după fertilizare și contribuie la formarea axei anteroposterior a embrionului [Figura 18.5(a)]. Multe produse genetice materne codifică factori de transcripție care activează transcripția genelor gap, a căror expresie împarte embrionul într-o serie de regiuni corespunzătoare capului, toracelui și abdomenului adult [Figura 18.5(b)]. Proteinele gap, la rândul lor , acționează ca un alt grup de factori de transcripție care activează genele pair-rule, ale căror produse împart embrionul în regiuni mai mici, de aproximativ două segmente lățime [Figura 18.5(c)]. La rândul lor, genele pair-rule activează genele de polaritate a segmentului , care apoi împart - fiecare segment în regiuni anterioare și posterioare [Figura 18.5(d)]. Acțiunea combinată a genelor materne care formează axa anteroposterioară și a genelor de segmentare definește domeniile de acțiune ale genelor homeotice (Hcw) [Figura 18.5(e)].

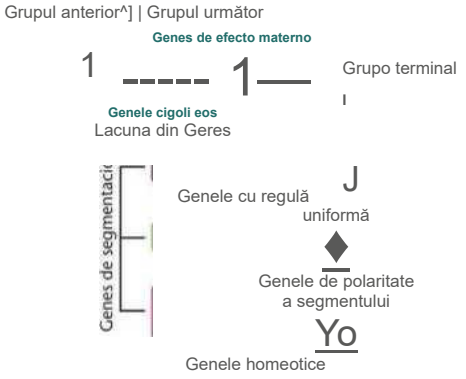


FIGURA 18.4 Ierarhia genelor implicate în stabilirea planului corporal segmentat al *Drosophilei.* Produșii genetici din genele matre reglează expresia primelor trei grupuri de gene eigoice (genele gap, pair rule și segment polarity, denumite colectiv gene de segmentare), care la rândul lor controlează expresia genelor homeotice.

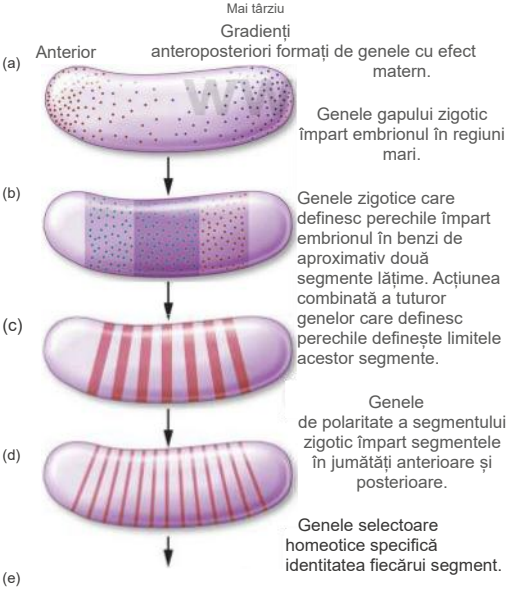

Mai târziu
Gradienți anteroposteriori formați de genele cu efect matern.
Anterior
(a)
WT
Genele gapului zigotic împart embrionul în regiuni mari.
(b)
Genele zigotice care definesc perechile împart embrionul în benzi de aproximativ două segmente lățime. Acțiunea combinată a tuturor genelor care definesc perechile definește limitele acestor segmente.
(c)
Genele de polaritate a segmentului zigotic împart segmentele în jumătăți anterioare și posterioare.
(d)
Genele selectoare homeotice specifică identitatea fiecărui segment.
(e)

FIGURA 18.5 (a) Restricționarea progresivă a destinului celular în timpul dezvoltării la *Drosophila. Gradienții proteici materni se stabilesc* de-a lungul axei anteroposterior a embrionului, (b), (c) și (d) Trei grupuri de gene de segmentare care definesc progresiv segmentele corpului, (e) Genele homeotice conferă identitate fiecărui segment.

18.1 Să presupunem că efectuăm o analiză a mutațiilor cu efect matern la *Drosophila* care afectează structurile externe ale embrionului, iar această analiză identifică peste 100 de mutații care afectează structurile externe. Pe

AHORA RESUELVA ESTO

baza propriilor analize, alți cercetători au concluzionat că există aproximativ 40 de gene cu efect matern. Cum putem reconcilia rezultatele noastre cu cele ale acestor alți cercetători?

- SUGESTIE 1 Această *problemă necesită înțelegerea modului în care - funcționează urmărirea mutanților. Odată ce mutanții sunt identificați, aceștia trebuie dozați folosind analiza complementării (Capitolul 4). Cheia rezolvării acestei probleme este reținerea diferenței dintre gene și alele.*

18.4

Genele zigotice programează formarea segmentelor la *Drosophila*

Expresia sau represia genelor zigotice în timpul dezvoltării embrionare are loc ca răspuns la gradientul poziţional al produselor genelor cu efect matern în citoplasmă. Expresia secvențială a trei subgrupuri de gene de clivaj împarte embrionul într-o serie de segmente de-a lungul axei uteroposterioare. Aceste gene de clivaj sunt în mod normal transcrise în embrionul în curs de dezvoltare, iar mutațiile lor au ca rezultat fenotipuri letale embrionare.

Au fost identificate aproximativ 20 de gene de segmentare (Tabelul 18.1). Acestea sunt clasificate în funcție de fenotipurile lor mutante : (1) mutațiile din genele gap șterg un grup de segmente adiacente, (2) mutațiile din genele pair-rule afectează segmente alternative și șterg o parte specifică a fiecărui segment afectat și (3) mutațiile din genele de polaritate a segmentului provoacă defecte în porțiunile omoloage ale fiecărui segment.

TABLA 18.1 1 Genes de segmentación en ***Drosophila***

Genes Gap	Genes de la regia p^r	Genes de polaridad de los segmentos
Krüppel	*hairy*	*engrailed*
knirps	*even-skipped*	*wingless*
hunchback	*runt*	*cubitis*
giant	*fushi-tarazu*	*hedgehog*
tailless	*paired*	*fused*
huckebein	*odd-paired*	*armadillo*
caudal	*odd-skipped sloppy-paired*	*patched gooseberry* *paired naked disheveled*

Pe lângă genele care determină axa anteroposterioră a embrionului în curs de dezvoltare, axa dorsoventrală a embrionului este organizată printr-o combinație de gene și produse genetice materne și zigotice. Discuția noastră se va limita la genele implicate în stabilirea axei anteroposterior. Vom examina acum în detaliu fiecare membru al acestui grup.

Decalaj genetic

Genele gap sunt activate sau inactivate de produse genetice exprimate anterior de-a lungul axei anteroposterior și de alte gene ale sistemului gradient matern . Atunci când sunt mutate, aceste gene produc goluri mari în modelul de segmentare a embrionului . Mutanții genei *Hunchback* pierd structurile cefalice și toracice, mutanții *Krüppel* pierd structurile toracice și abdominale , iar - mutanții *Knirps* pierd majoritatea structurilor abdominale . Transcripția genelor gap de tip sălbatic (care codifică factorii de transcripție) împarte embrionul într-o serie de regiuni mari care vor forma capul , toracele și abdomenul. În cadrul acestor regiuni, modele specifice de expresie genică determină atât tipul de segment care se va forma , cât și ordinea corectă a segmentelor în corpurile larvar, pupal și adult . Modelele regionale de expresie a genei gap în diferite părți ale embrionului sunt corelate aproximativ cu locația fenotipurilor lor mutante : *hunchback* în partea anterioară, *Krüpel* în partea centrală (Figura 18.6) și *knirps* în partea posterioară. Așa cum am menționat anterior, genele gap codifică factorii de transcripție care controlează expresia genelor even -rule .

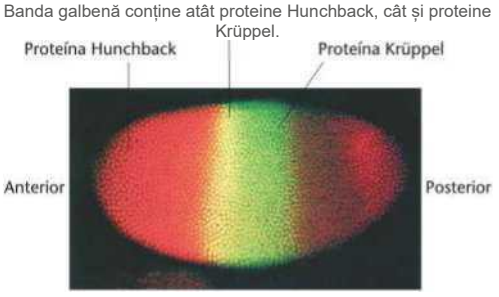


FIGURA 18.6 Expresia mai multor gene gap într -un embrion de Drosophila . Proteina Hunchback este prezentată în portocaliu, iar proteina Krüppel este indicată în verde. Banda galbenă apare atunci când celulele conțin atât proteine Hunchback , cât și proteine Krüppel. Fiecare punct din embrion reprezintă un nucleu.

Genele cu regulă uniformă

Genele de tip „pair rule ” sunt exprimate într-o serie de șapte benzi sau dungi înguste care se întind pe întreaga circumferință a embrionului. Expresia acestui set de gene stabilește mai întâi limitele segmentelor și apoi soarta dezvoltării celulelor din fiecare segment, controlând expresia genelor de polaritate a segmentului. Mutațiile din genele de tip „pair rule” elimină secțiuni care se întind pe un segment întreg la fiecare două segmente. Există cel puțin opt gene de tip „pair rule” care acționează pentru a diviza embrionul într-o serie de benzi. Cu toate acestea, limitele acestor benzi se suprapun, astfel încât în fiecare zonă de suprapunere, celulele exprimă o combinație diferită de gene de tip „pair rule” (Figura 18.7). Transcripția genelor de tip „pair rule” este mediată de acțiunea produselor genelor gap și a produselor genelor materne, dar rezoluția acestui model de segmentare în dungi perfect delimitate rezultă din interacțiunea dintre produsele genetice ale genelor de tip „pair rule” în sine (Figura 18.8).

Genele de polaritate a segmentului

Factorii de transcripție codificați de genele regulii perechilor controlează expresia genelor de polaritate a segmentului. În cadrul fiecărui segment creat de

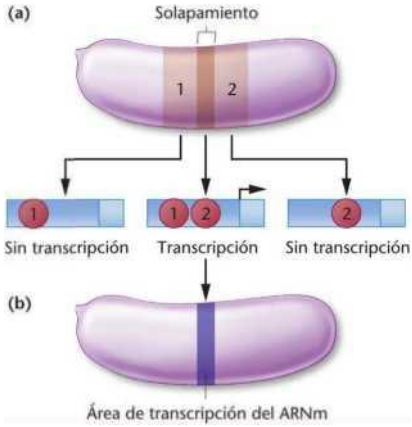
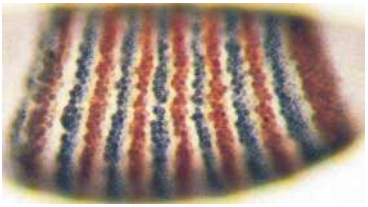
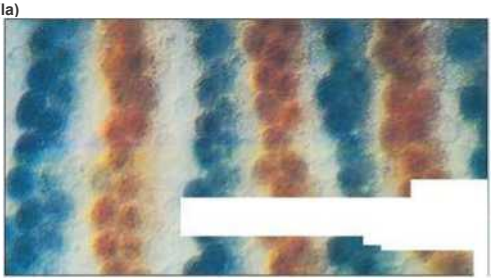


FIGURA 18.7 Noi modele de expresie genică pot fi generate prin regiuni suprapuse care conțin două produse genetice diferite. (a) Factorii de transcripție 1 și 2 sunt localizați într-o regiune de expresie suprapusă. Dacă ambii factori de transcripție trebuie să se lege de promotorul unei gene țintă pentru a declanșa expresia acesteia, gena va fi activată numai în celulele care conțin ambii factori (cel mai probabil în zona de suprapunere). (b) Expresia genei țintă în regiunea restricționată a embrionului.



(la)



(b)

FIGURA 18.8 Model de benzi ale expresiei genelor even-rule la un *embrion de Drosophila*. Acest embrion este colorat pentru a arăta modelele de expresie ale genelor *even- skipped și fushi-tarazw,* (a) vedere la mărire mică și (b) vedere la mărire mai mare a aceluiași embrion.

Genele de regulă pereche, genele de polaritate segmentală, sunt activate într-o singură bandă de celule care se extinde în jurul circumferinței embrionului (Figura 18.9). Aceasta împarte embrionul în 14 segmente. Produșii genelor de polaritate segmentală controlează identitatea celulelor și stabilesc modelul anteroposterior (polaritatea) în cadrul fiecărui segment.

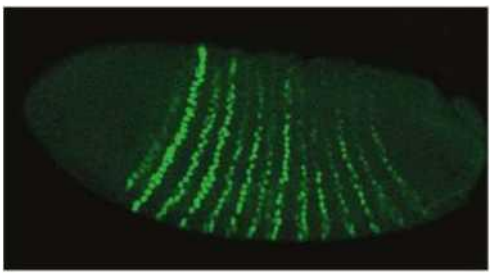


FIGURA 18.9 Cele 14 benzi de expresie genică de polaritate ale segmentelor *încrustate* într-un embrion de Drosophila .

Genele de segmentare la șoareci și oameni

Am văzut că formarea segmentelor la *Drosophila* depinde de acțiunea a trei subseturi de gene de segmentare . Dacă vom folosi *Drosophila* ca model util pentru înțelegerea principiilor generale ale dezvoltării animalelor , este logic să ne întrebăm dacă această familie de gene se găsește și la oameni și la alte mamifere și, dacă da, dacă controlează aspecte ale dezvoltării embrionare la alte organisme. Pentru a răspunde la această întrebare, să examinăm *runt,* una dintre genele de tip pereche la *Drosophila* . În stadiile ulterioare de dezvoltare, aceasta controlează aspecte ale determinării sexului și formării sistemului nervos . Gena codifică o proteină care reglează transcripția genelor sale țintă și conține o regiune de legare a ADN-ului de 128 de aminoacizi (numită domeniul runt) care este extrem de conservată în proteinele șoarecilor și oamenilor . De fapt, experimentele *in vitro arată că* proteinele runt de la *Drosophila* și de la șoarece sunt - interschimbabile funcțional. La șoareci, *runt* este exprimat la începutul dezvoltării și controlează formarea celulelor sanguine, a oaselor și a sistemului reproducător. Deși seturile de gene țintă controlate de *runt* diferă la *Drosophila* și șoareci, în ambele organisme expresia *runt* specifică soarta celulelor embrionare nediferențiate prin reglarea transcripției genelor țintă.

La oameni , mutația *RUNX2* , un omolog uman al *genei runt,* provoacă displazie cleidocraniană (CCD), o trăsătură autosomală moștenită dominant . Persoanele cu CCD au o gaură în partea superioară a craniului deoarece fontanela lor nu se închide. Claviculele lor nu se dezvoltă, permițându -le să își îndoaie umerii în sus (Figura 18.10). Șoarecii cu o copie mutantă a omologului *runt* au un fenotip similar cu cel observat la oameni; șoarecii cu două copii ale genei nu au deloc oase . Scheletele lor conțin doar cartilaj, la fel ca cele ale rechinilor (Figura 18.11), subliniind rolul crucial al *genei runt* la aceste specii ca genă ce controlează inițierea formării osoase.

18,5

Genele selectoare homeotice specifică părțile corpului adult

Odată ce limitele segmentelor sunt stabilite prin acțiunea genelor de clivaj, genele homeotice sunt activate. Expresia genelor selectoare homeotice determină structurile adulte care se vor forma în fiecare segment.

SAU

f.

FIGURA 18.10 Un copil afectat de displazie cleidocraniană (CCD). Această afecțiune, care se transmite autosomal dominant, este cauzată de o mutație a unei gene umane runt, RUNX2. Persoanele heterozigote afectate au diverse defecte scheletice, inclusiv o gaură în partea superioară a craniului unde fontanela infantilă nu se închide, precum și clavicule care fie nu se dezvoltă , fie sunt doar niște cioturi mici. Deoarece claviculele nu se formează, persoanele cu CCD își pot îndoi umerii în sus . Retipărit *cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd.: Fig. 1, p. 244 din: British Dental Journal 195: 243-248 2003. Greenwood, M. și Meechan, JC „Medicină generală și chirurgie pentru practicienii dentari”. Copyright © Macmillan Magazines Limited.*

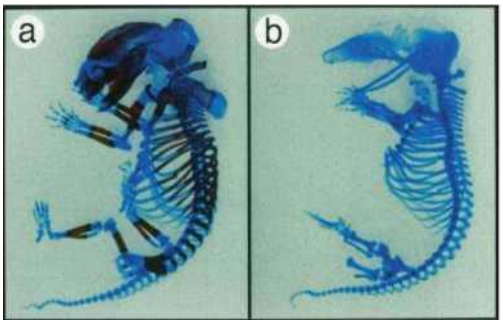
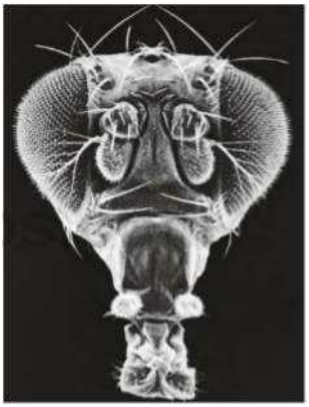


FIGURA 18.11 Formarea osoasă la șoarecii normali și la mutanții pentru *gena Runx2.* (a) Embrionii normali de șoarece prezintă atât cartilaj (albastru), cât și os (maro) în ziua 17,5. (b) Scheletul de 17,5 zile al unui embrion mutant homozigot. În schelet s -a format doar cartilaj . Există o absență completă a formării osoase la șoarecele mutant. Exprimarea unei copii normale a genei *Runx2* este esențială pentru a specifica soarta de dezvoltare a osteoblastelor care formează os într-un segment corporal. La *Drosophila,* acestea includ antenele, aparatul bucal, picioarele, aripile, toracele și abdomenul. Mutanții acestor gene sunt numiți mutanți homeotici deoarece structura formată de un segment este transformată în cea formată de un alt segment. De exemplu, alela de tip sălbatic a genei *Antennapedia (Antp)* specifică formarea unui picior pe al doilea segment toracic. Mutațiile *Antp* cu câștig dominant de funcție determină exprimarea acestei gene și în cap, iar la mușchii mutante antena este transformată într- un picior (Figura 18.12).

Genele *Hox* în *Drosophila*

Genomul *Drosophila* conține două grupuri de gene selectoare homeotice (numite) pe cromozomul 3



(la)

(b)

FIGURA 18.12 Mutația Antennapedia (Antp) la *Drosophila* . (a) Capul Drosophilei (a) Tip sălbatic , care prezintă antenele și alte părți ale capului; (b) Capul unui mutant Antp, care prezintă înlocuirea antenelor normale cu picioare. Aceasta este cauzată de activarea genei Antp în regiunea capului.

Genele Hox) care codifică factorii de transcripție (Tabelul 18.2). Grupul Antennapedia *(ANT-C)* conține cinci gene care specifică structurile din cap și primele două segmente toracice [Figura 18.13(a)]. Al doilea grup, *complexul bithorax (BX-C),* conține trei gene care specifică structurile din partea posterioară a celui de-al doilea segment toracic, din întregul al treilea segment toracic și din segmentele abdominale [Figura 18.13(b)].

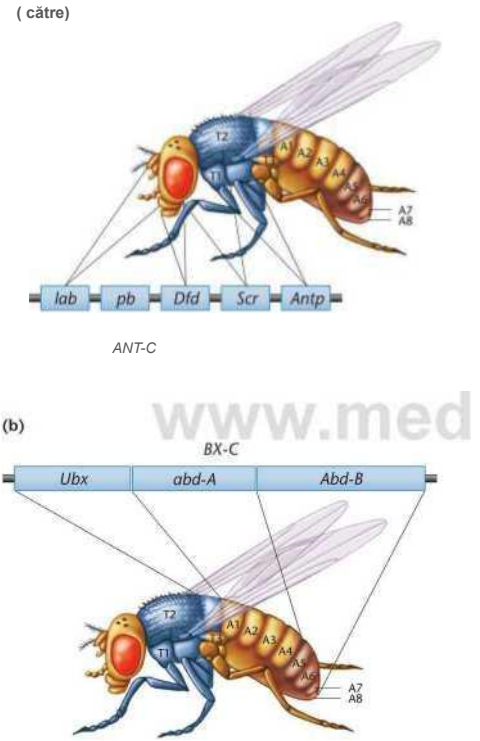


FIGURA 18.13 Genele complexului *Antennapedia* și structurile adulte pe care le specifică. (a) În complexul ANT-C, genele *labial* (lab) și *Deformed (Dfd) controlează formarea segmentelor capului.* Genele *Sex comb reduced* (Ser) și *Antennapedia (Antp)* specifică identitatea primelor două segmente toracice, T1 și T2. Gena rămasă din complex, *proboscipedia* (pb), poate să nu acționeze în timpul embriogenezei, dar poate fi necesară pentru menținerea stării diferențiate la adulți. La mutanți, palpii maxilari sunt transformați în picioare. (b) În complexul BX-C, *Ultrabithorax* (Ubx) controlează formarea structurilor compartimentului posterior al T2 și a structurilor T3. Celelalte două gene, *abdominal A* (abdA) *și Abdominal B* (AbdB), specifică identitățile celor opt segmente abdominale (A1-A8).

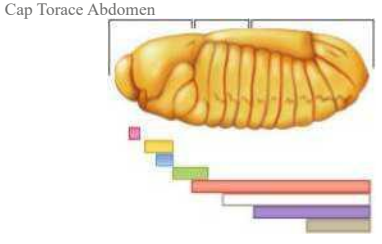
Genele *Hox ale* Drosophilei .

Complexul *Antennapedia*	Complexul *Bithorax*
TABLA 18.2 *Balsam de buze Antenapedia*	*Ultrabithorax abdominală A*
Piepteni sexuali reduc ți	*pentru zona abdominală B*
Proboscipedia deformată	

Genele *Hox* (enumerate în Tabelul 18.2) au două proprietăți comune. În primul rând, fiecare include un domeniu de 180 de perechi de baze, cunoscut sub numele de homeobox . (Hox este prescurtarea de la homeobox.) Homeobox- ul codifică o secvență de legare a ADN-ului formată din 60 de aminoacizi, numită homeodomeniu . În al doilea rând, la majoritatea speciilor, expresia genelor este coliniară cu organizarea anteroposterioară a corpului. Genele de la capătul 3' al unui grup sunt exprimate la capătul anterior al embrionului, cele din secțiunea mediană sunt exprimate în secțiunea mediană a embrionului, iar genele de la capătul 5' al unui grup sunt exprimate în regiunea posterioară a embrionului (Figura 18.14). Deși genele *Hox* au fost identificate pentru prima dată la *Drosophila,* acestea se găsesc în genomurile majorității eucariotelor cu o structură corporală segmentată, cum ar fi nematodele, aricii de mare, peștele zebră, anuranii, șoarecii și oamenii (Figura 18.15).

dezvoltarea *Drosophila* acționează într-o cascadă ordonată.

(a) Domeniile de expresie ale genelor homeotice

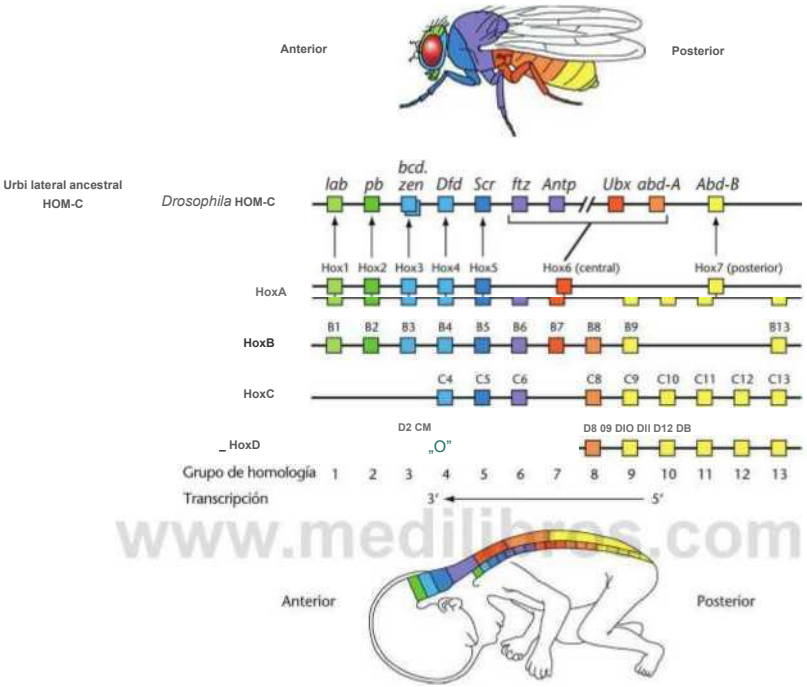


(b) Poziția genelor homeotice pe cromozom

-, lab pb Dfd Ser Antp . Ubx obd-A Abd-B

i. H niqtiLÍ n

FIGURA 18.14 Relații coliniare între modelul spațial de expresie și locațiile cromozomiale ale genelor homeotice la *Drosophila,* (a) Embrionul *de Drosophila* și domeniile de expresie ale genelor homeotice în epiderma și sistemul nervos central al embrionului, (b) Poziția pe cromozom a genelor selectoare homeotice. Rețineți că ordinea genelor pe cromozom este corelată cu limitele secvențiale de mai sus ale domeniilor lor de expresie .



www.medilibros.com

FIGURA 18.15 Conservarea modelelor de organizare și expresie ale genelor Hox . (Mai sus) Sunt prezentate structurile formate la Drosophila adultă , culorile corespunzătoare membrilor grupului Hox . care controlează formarea sa . (Mijloc) Reconstrucția grupării *Hox* a strămoșului comun al tuturor organismelor bilaterale are șapte gene. (Jos) Aranjamentul și modelele de expresie ale celor patru grupuri de gene *Hox* într-un embrion uman în stadiu incipient . Rețineți că unele gene ulterioare sunt exprimate în membre. Modelul de expresie este dedus din cel observat la șoareci. Ca și în *Drosophila,* Genele de la capătul 3' al clusterului formează structurile anterioare, iar cele de la capătul 5' formează structurile posterioare. Genele omologe cu secvența ancestrală (datorită duplicărilor) sunt indicate între paranteze pătrate.

Temporal și spațial, acest proces începe cu genele care stabilesc axa anteroposterioară (și dorsoventrală) a ovulului și a embrionului timpuriu. Gradienții de ARNm matern și proteine de-a lungul axei anteroposterior activează genele gap, care subdivid embrionul în benzi largi. La rândul lor, genele gap activează genele de tip „pair-rule", care împart embrionul în segmente. Grupul final de gene de segmentare, genele de polaritate a segmentului, împart fiecare segment în regiuni anterioare și posterioare dispuse liniar de-a lungul axei anteroposterior. Genele *Hox* conferă apoi identitate segmentelor. Astfel, această restricționare progresivă a potențialului de dezvoltare al celulelor embrionare *Drosophila* (toate acestea având loc în prima treime a embriogenezei) implică o cascadă de acțiune genică, proteinele reglatoare acționând asupra transcripției, traducerii și transducției semnalului.

Genele Hox și tulburările genetice umane

Deși descrise pentru prima dată la *Drosophila, genele Hox* cu un grad ridicat de omologie se găsesc în genomurile tuturor animalelor ; aceste gene

joacă un rol fundamental în modelarea corpului și a anexelor sale. La vertebrate, conservarea secvenței, a ordinii genelor în cadrul grupurilor *Hox* și a modelului lor de expresie sugerează că, la fel ca la *Drosophila* , aceste gene controlează dezvoltarea de-a lungul axei anteroposterior și formarea anexelor (Figura 18.16). Cu toate acestea, la vertebrate, inclusiv șoareci și oameni, există patru *grupuri de gene Hox: HOXA, HOXB, HOXC* și *HOXD,* mai degrabă decât una singură ca la *Drosophila.* Aceasta implică faptul că, la vertebrate , nu este implicată o singură *genă Hox,* ci o combinație de 2-4 *gene Hox* în formarea unor structuri specifice. Prin urmare, mutațiile homeotice ale genelor *Hox individuale* la vertebrate nu produc transformări complete, așa cum se întâmplă în cazul *speciei Drosophila , unde o singură* mutație a genei *Hox* poate transforma un șeful de picior într-o aripă *(vezi* fotografia de la începutul capitolului). În ciuda acestor diferențe, rolul genelor *HOXD* în dezvoltarea umană a fost confirmat de descoperirea faptului că mai multe malformații moștenite ale membrelor sunt cauzate de mutații ale genelor *HOXD* . De exemplu, mutația *HOXD 13* are ca rezultat simpolidactilie (SPD), o malformație caracterizată prin două degete în plus la mâini și la picioare și anomalii la nivelul oaselor mâinilor și picioarelor (Figura 18.17).

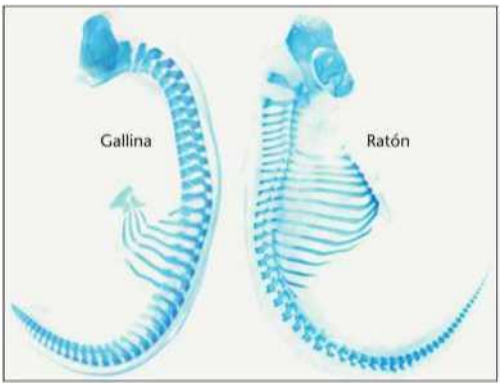


FIGURA 18.16 Modelele de expresie ale genelor *Hox* controlează formarea structurilor de-a lungul axei anteroposterior la animalele cu simetrie bilaterală, acest control fiind exercitat într-o manieră specifică speciei. La pui (stânga) și șoareci (dreapta), expresia aceluiași grup de gene *Hox* este programată diferențiat în timp și spațiu , rezultând forme distincte ale corpului.

ACUM REZOLVĂ ASTA

18.2 *fushi taraza (ftz)* și *engrailed (eng)* ale speciei *Drosophi la* Acestea codifică factorii de transcripție homeobox și pot induce expresia altor gene. Ambele gene acționează aproximativ în același timp în timpul dezvoltării și în aceeași regiune pentru a specifica soarta celulelor în segmentele corpului . Pentru a determina dacă *ftz* reglează expresia genelor engrailed , dacă *engrailed* reglează *ftz* sau dacă ambele sunt reglate de o altă genă, a fost efectuată o analiză mutațională. În embrionii /tz9 *(ftz/ftz)* , nu există proteină *în grailed.* în embrioni *gravați (eng/eng),* Expresia genei *FTZ* este normală. Ce ne spune acest lucru despre reglarea acestor două gene - gena englailed *?* Gena *FTZ* reglează FTZ sau gena *FTZ* reglează engrailed *?*

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea reglării expresiei genelor de către factorii transactivi (vezi Capitolul 17). Cheia rezolvării acesteia constă în analiza fondului genetic al fiecărei tulpini mutante.*

FIGURA 18.17 Mutațiile genelor *Hox* posterioare (în acest caz, HOXD13 *)* la oameni duc la malformații ale membrelor , reprezentate aici ca degete suplimentare. Acest fenotip este cunoscut sub numele de simpolidactilie. *Mutații* în *HOXD13* De asemenea , sunt asociate cu anomalii ale oaselor mâinilor și picioarelor.

18,6

Plantele au dezvoltat sisteme de dezvoltare paralele cu cele ale animalelor

Plantele și animalele s-au desprins dintr-un strămoș unicelular comun acum aproximativ 1,6 miliarde de ani, după originea eucariotelor și probabil înainte de apariția organismelor multicelulare . Analiza genomică a mutanților la plante și animale indică faptul că mecanismele de bază ale formării tiparelor

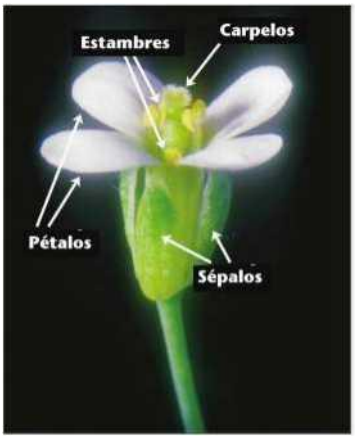
de dezvoltare au evoluat independent la animale și plante. Am examinat deja sistemele genetice care controlează dezvoltarea și formarea tiparelor la animale , folosind *Drosophila* ca organism model.

La plante, formarea modelelor a fost studiată folosind dezvoltarea florilor la organismul model *Arabidopsis thaliana* (Figura 18.18), o plantă mică din familia muștarului . Un grup de celule nediferențiate, numit *meristem floral,* dă naștere florilor (Figura 18.19). Fiecare floare este formată din patru organe - sepale, petale, stamine și carpele - care se dezvoltă din inele concentrice de celule meristemice (Figura 18.20). Fiecare organ se dezvoltă dintr-un inel concentric sau spirală de celule diferită .

Genele homeotice în *Arabidopsis*

Trei clase de gene homeotice florale controlează dezvoltarea acestor organe (Tabelul 18.3). Genele din clasa A specifică sepalele, genele din clasele A și B specifică petalele, genele din clasele B și C controlează formarea staminelor , iar genele din clasa C specifică carpele. În timpul dezvoltării florale [Figura 18.21(a)], genele din clasa A sunt active în verticile 1 și 2 (sepale și petale), genele din clasa B sunt exprimate în verticile 2 și 3 (petale și stamine), iar genele din clasa C sunt exprimate în verticile 3 și 4 (stamine și carpele). Organele formate depind de modelele de expresie ale celor trei clase de gene. Dacă sunt exprimate doar genele din clasa A, se formează sepalele. Dacă sunt exprimate atât genele din clasa A, *cât și cele din clasa* B , se formează carpele.

FIGURA 18.18 La faneróga*ma Arabidopsis thaliana,* utilizada como organismo modelo en genética vegetal.



(a)

<b)

FIGURA 18.19 (a) Părți ale *florii de Arabidopsis*. Organele florale sunt dispuse concentric. Sepalele formează inelul exterior, urmate de petale și stamine, cu carpelele în interior. (b) Vedere a florii de sus.

Petalele se formează în verticilul 2. Activitatea genelor din clasele B și C în verticilul 3 duce la formarea staminelor . În verticilul 4 , exprimarea genelor din clasa C duce la formarea carpelelor .

Genele selectoare homeotice în *Arabidopsis*

TABLA 18.3

	APETALA 1 (AP1) APETALA2 (AP2) APETALA3 (AP3) PISTILLATA (P1) AGAMOUS (AG)
Clase A	
Clase B	
Clase C	

Prin convenție, genele de tip sălbatic ale *Arabidopsis* Sunt scrise cu majuscule

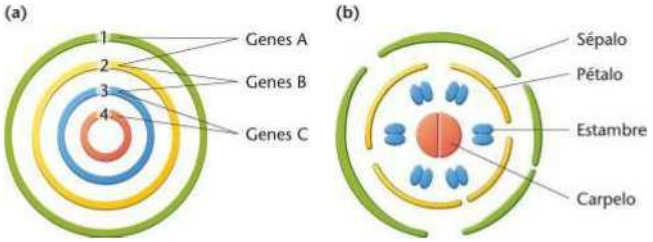


FIGURA 18.20 Aranjamentul celulelor în meristemul floral, (a) Cele patru inele concentrice, sau verticile, numerotate de la 1 la 4, dau naștere (b) Aranjamentul sepalelor, petalelor, staminelor și carpelelor în floarea matură.

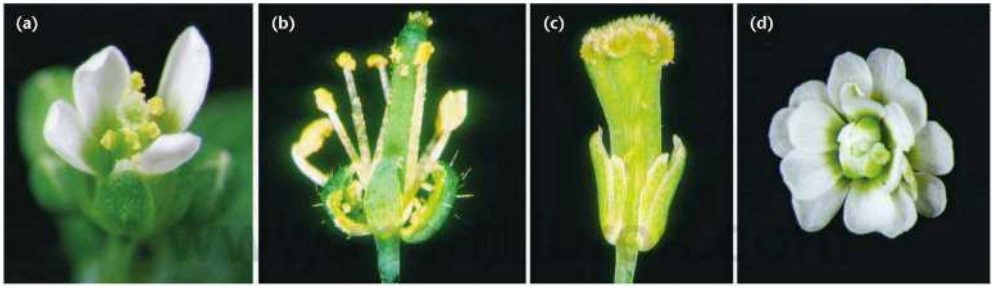


FIGURA 18.21 (a) Acțiunea individuală și combinată a genelor din clasele A, B și C formează sepalele, petalele, staminele și carpelele florilor sălbatice de Arabidopsis . (b) Floarea mutantă homeotică *APETALA2* (un mutant de clasa A) are carpele, stamine, stamine și carpele, (c) mutanți de clasa B *(ap3 și pi)* Au sepale, sepale, carpele *și* carpele, (d) Mutanții din clasa C (ag) au petale și sepale în locurile unde s-ar fi format staminele și carpele .

Ca și în cazul *Drosophilei,* Mutațiile genelor homeotice duc la formarea de organe în locații anormale . De exemplu, la mutanții *APETALA2 (ap2) ,* ordinea organelor este carpele, stamine, stamine și carpele, în loc de ordinea normală sepale, petale , stamine și carpele [Figura 18.21(b)]. La mutanții cu pierdere de funcție din clasa B *(api, pi),* petalele devin sepale, iar staminele devin carpele [Figura 18.21(c)] , iar ordinea organelor devine sepal , sepal, carpel, carpel. Plantele care au o mutație pentru gena *AGAMOUS din* clasa C vor avea petale în verticilul 3 (în loc de stamine) și sepale în verticilul 4 (în loc de carpele), iar ordinea organelor va fi sepal, petală, petală și sepal [Figura 18.21 (d)] .

Divergența evolutivă a genelor homeotice

Drosophila și *Arabidopsis* utilizează seturi diferite de gene reglatoare principale neomoloage pentru a stabili axa corpului și pentru a specifica identitatea structurilor de-a lungul axei. La *Drosophila,* această sarcină este îndeplinită parțial de *genele Hox,* care codifică un grup de factori de transcripție ce au în comun un domeniu homeotic. Cu toate acestea, la *Arabidopsis,* genele homeotice florale aparțin unei familii distincte de factori de transcripție numiți proteine MADS box, caracterizați printr-o secvență comună de 58 de aminoacizi , fără legătură cu secvența de aminoacizi sau structura proteică a genelor *Hox* . Ambele seturi de gene codifică factori de transcripție, ambele seturi fiind regulatori principali ai dezvoltării exprimați într-un model de domenii suprapuse și ambele specifică identitatea structurilor.

Reflectând originile lor evolutive comune de la un strămoș comun, genomurile atât ale *Drosophilei* , cât și ale *Arabidopsisului* conțin membri ai genelor homeobox și MADS box, dar aceste gene s-au adaptat la utilizări distincte în regnurile vegetal și animal, indicând

că mecanismele de dezvoltare au evoluat independent în fiecare grup.

Atât la plante, cât și la animale, acțiunea factorilor de transcripție depinde de modificările structurii cromatinei care permit exprimarea genelor. Mecanismele de inițiere a transcripției sunt conservate la plante și animale, iar acest lucru se reflectă în omologia genelor din *Drosophila* și *Arabidopsis* , care mențin - modele de expresie inițiate de grupuri de gene reglatoare. Acțiunea genelor homeotice florale este controlată de o genă numită *CURLY LEAF.* Această genă are o omologie semnificativă cu membrii familiei de gene *Polycomb* din *Drosophila.* Această familie de gene reglatoare controlează expresia genelor homeobox în timpul dezvoltării. Atât *CURLY LEAF* , cât și *Polycomb* codifică proteine care modifică conformația cromatinei și dezactivează expresia genelor. Astfel, deși sunt utilizate gene diferite pentru a controla dezvoltarea, atât plantele, cât și animalele utilizează un mecanism conservat evolutiv pentru a regla expresia acestor grupuri de gene.

18,7

Interacțiunile celulare în timpul dezvoltării sunt modelate în C. *elegans*

În dezvoltarea organismelor multicelulare, interacțiunile celulă - celulă influențează modelele de transcripție și soarta dezvoltării celulelor vecine. Această interacțiune celulă-celulă este un proces important în dezvoltarea embrionară a majorității organismelor eucariote , cum ar fi Drosophila , precum și la vertebrate, inclusiv șoareci și oameni.

Trasee de semnalizare în curs de dezvoltare

În primele etape ale dezvoltării , animalele utilizează o serie de căi de semnalizare pentru a regla dezvoltarea; după ce începe formarea organelor, se adaugă căi de semnalizare suplimentare la cele deja utilizate. Aceste căi nou create acționează atât independent , cât și în rețele coordonate pentru a induce răspunsuri transcripționale specifice. Rețelele de semnalizare stabilesc polaritatea anteroposterioară și axele corpului, coordonează formarea modelelor și direcționează diferențierea țesuturilor și organelor. Tabelul 18.4 enumeră căile de semnalizare utilizate în primele etape ale dezvoltării și unele dintre procesele de dezvoltare pe care le controlează . După o introducere în componentele și interacțiunile unuia dintre aceste sisteme - calea de semnalizare Notch - vom examina pe scurt rolul său în dezvoltarea vulvei la nematodul Caenorhabditis elegans .

TABLA 18.4 Căile de semnalizare utilizate în dezvoltarea embrionară timpurie

Ruta Vest Dorsalizarea corpului ; Dezvoltarea reproductivă a femelei; Diferențe dorsoventrale
Ruta TGF-0 Inducția mezodermului Asimetrie stânga-dreapta Dezvoltarea osoasă
Calea ariciului Inducția notocordului Somitogeneză Mezoderm intestin/viscere
Calea receptorilor tirozin kinazei prin menținerea mezodermului
Calea de semnalizare Notch Dezvoltarea celulelor sanguine Neurogeneză Dezvoltarea retinei

Fântână: **Gerhart, J. 1999. Reading Warkany 1998: Căi de semnalizare în dezvoltare.** ***Teratology*** **60:226-39.**

Calea de semnalizare Notch

Genele din calea Notch *sunt* numite după mulantele Drosophila . care au fost utilizate pentru a identifica componentele acestui sistem de transducție a semnalului . Notch acționează prin contact direct între celule pentru a controla soarta dezvoltării celulelor care - interacționează . Gena *Notch* (și gena echivalentă în alte organisme) codifică un receptor de semnal încorporat în membrana plasmatică (Figura 18.22). Semnalul este o altă proteină membranară codificată de gena Delta (și echivalentele sale). Deoarece atât semnalul, cât și receptorul sunt proteine membranare , sistemul de semnalizare Notch operează între celulele *adiacente* . Când proteina de semnalizare Delta se leagă de proteina receptor Notch , capătul citoplasmatic al proteinei Notch se detașează și se leagă de o proteină citoplasmatică codificată de gena Su (H) (supresor Hairless) . Acest complex proteic *se* translocă în nucleu și se leagă de cofactori de transcripție care activează transcripția unui set de gene care controlează o anumită cale de dezvoltare (Figura 18.22) .

Unul dintre principalele roluri ale sistemului de semnalizare Notch este de a specifica soarta celulelor echivalente dintr -o populație. În forma sa cea mai simplă , această interacțiune implică două celule vecine care sunt echivalente din punct de vedere al dezvoltării . Vom explora rolul sistemului de semnalizare Notch în dezvoltarea vulvei la *C. elegans.* după o scurtă introducere despre embriogeneza nematodelor.

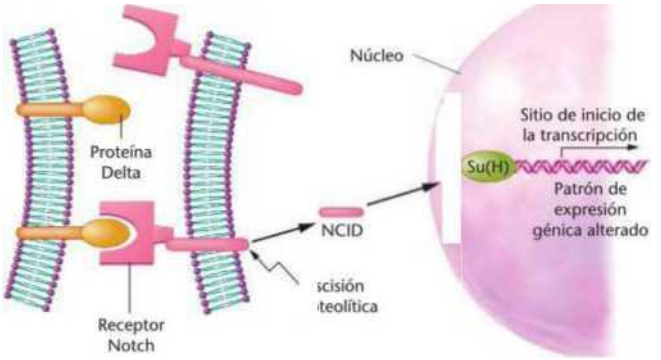


FIGURA 18,22 Componentele căii de semnalizare Notch la *Drosophila*. Celula care poartă proteina transmembranară Delta trimite semnalul ; celula care poartă proteina transmembranară Notch îl primește . Legarea proteinei Delta de Notch declanșează activarea transcripției unui mediator proteolitic. Fragmentul scindat de partea citoplasmatică a proteinei Notch , numit domeniul intracelular Notch (NCID), se combină cu proteina Su(H) și se translocă în nucleu , unde activează un program de transcripție genică .

Informații generale despre dezvoltarea lui C *elegans*

Nematodul C. *degans este* utilizat pe scară largă pentru studierea controlului genetic al dezvoltării. Acest organism oferă mai multe avantaje pentru astfel de studii: (1) genetica organismului este bine cunoscută, (2) secvența genomului său este disponibilă și (3) adulții sunt compuși dintr-un număr mic de celule care urmează un program de dezvoltare extrem de determinist. Nematodele adulte au aproximativ 1 mm lungime și se maturizează dintr-un ou fertilizat în aproximativ două zile (Figura 18.23). Ciclul lor de viață constă dintr-un stadiu embrionar (aproximativ 16 ore), patru stadii larvare (L1 până la L4) și stadiul adult. Adulții sunt fie hermafroditi XX autofertilizați, capabili să producă

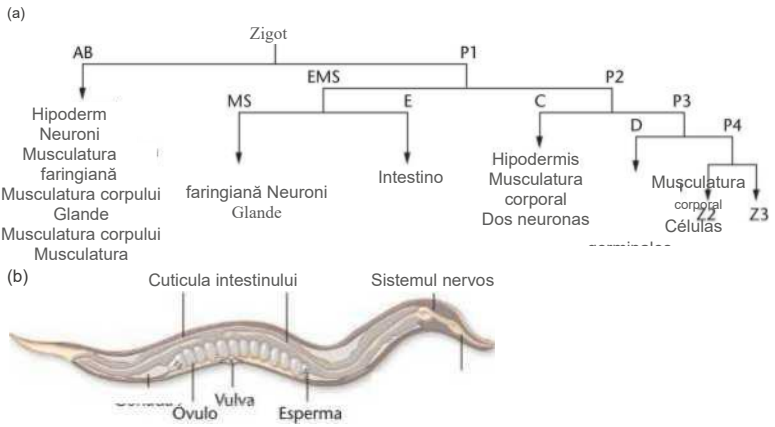


FIGURA 18.23 (a) Diagramă simplificată a unei *linii celulare de C. elegans,* care prezintă primele diviziuni și țesuturile *și* organele formate din aceste linii. Fiecare linie verticală reprezintă o diviziune celulară *, iar* liniile orizontale leagă cele două celule care au fost produse. De exemplu, prima diviziune celulară a zigotului creează două celule noi, AB *și* P1. În timpul embriogenezei, diviziunile celulare produc cele 959 de celule somatice ale nematodului hermafrodit adult. (b) Un C. *elegans hermafrodit adult.* Acest nematod, cu o lungime de aproximativ 1 mm, este alcătuit din 959 de celule *și* a fost utilizat ca organism model pentru a studia controlul genetic al dezvoltării.

atât ovule, cât și spermatozoizi, sau masculi XO. Autofertilizarea hermafroditilor tratați cu mutageni produce rapid tulpini mutante homozigote, sute de mutanți fiind generați , catalogați și cartografiați.

Hermafroditii adulți au 959 de celule somatice (și aproximativ 2.000 de celule germinale). Linia celulară exactă a fost cartografiată de la ovulul fertilizat până la adult (Figura 18.23) și este invariantă între indivizi, cu singura excepție a specificației celulei de ancorare/celule uterine ventrale, care este un eveniment aleatoriu (vezi Figura 18.24). Cunoașterea liniei celulare a fiecărei celule facilitează urmărirea evenimentelor cauzate de mutații care modifică soarta celulelor sau de eliminarea anumitor celule folosind microfascicule laser sau radiații ultraviolete. La *hermafroditii de C. ekgans,* soarta celulelor în timpul dezvoltării sistemului reproducător este determinată de

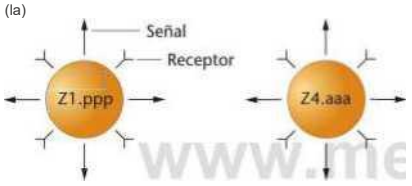

(la)
Señal
Receptor
Z1.ppp
Z4.aaa
În timpul L2, ambele celule încep să secrete semnale pentru diferențierea uterină.
(b)
Z1.ppp
Z4.aaa
Por azar, Z1 .ppp secreta más
Ca răspuns la semnal, Z4.aaa crește producția proteinei receptor LIN-12, determinând determinarea acesteia ca celulă precursoare uterină.
Yo
Se convierte en célula de anclaje
Devine o celulă precursoare uterină ventrală

FIGURA 1 8.24 Interacțiunea celulă-celulă în determinarea celulei de ancorare, (a) În timpul l_2, două celule vecine inițiază sinteza moleculelor de semnalizare și receptori pentru a induce diferențierea uterină, (b) Din întâmplare, celula Zl.ppp produce mai mult semnal, determinând celula Z4.aaa să crească producția receptorului de semnalizare. Acțiunea acestui semnal crescut face ca Z4.aaa să devină celula precursoare uterină ventrală *și* permite Zl.ppp să devină celula de ancorare.

ACUM REZOLVĂ ASTA

1S.3 Dezvoltarea vulvei la C. elegans *începe* cu interacțiunea dintre două celule vecine (Zl.ppp și 24.aaa) prin intermediul semnalelor celulă-celulă care implică două componente: o moleculă de semnalizare legată de membrană și un receptor legat de membrană. Din întâmplare, o celulă produce mai mult semnal, ceea ce, la rândul său, determină celula vecină să producă mai mulți receptori. Celula care produce semnalul devine celula ancoră, iar celula care produce mai mulți receptori devine celula precursoare uterină ventrală. Această formă de interacțiune celulă-celulă se numește sistemul de semnalizare Notch-Delta . Deși este un mecanism de semnalizare utilizat pe scară largă la metazoare , acest sistem acționează numai asupra celulelor adiacente. De ce se întâmplă acest lucru și care sunt avantajele și dezavantajele unui astfel de sistem?

- SUGESTIE: Această *problemă implică cunoașterea modului în care - funcționează sistemul de semnalizare celulă-celulă. Cheia rezolvării acesteia constă în înțelegerea interacțiunilor dinamice dintre sistemele de semnalizare și cele receptori în acest tip de semnalizare celulă-celulă.*

interacțiunile celulă-celulă și oferă câteva informații despre modul în care expresia genelor și interacțiunile celulă-celulă funcționează împreună pentru a specifica rezultatele dezvoltării .

Analiza genetică a formării vulvei

Hermafroditii adulți de C. *elegans* depun ouă prin vulvă , o deschidere situată aproximativ în centrul corpului (Figura 18.23). Vulva se formează în etape în timpul dezvoltării larvare și implică trei cicluri secvențiale de interacțiune celulă-celulă.

La C. eilegans, două celule vecine echivalente din punct de vedere al dezvoltării , Z1.ppp și Z4.aaa, interacționează una cu cealaltă, astfel încât una devine celula de ancorare gonadică , iar cealaltă devine un precursor uterin (Figura 18.24). Determinarea care dintre ele devine una sau alta are loc în timpul celui de-al doilea stadiu larvar (L2) și este controlată de gena receptorului Notch, *Un-12.* La genele mule recesive *Un-12(0)* (o mutație cu pierdere de funcție), ambele celule devin celule de ancorare . Mutația dominantă *liti-12(d)* (o mutație cu câștig de funcție) face ca ambele să devină precursori uterini. Astfel, expresia genei *Un-12* duce la selecția căii uterine, deoarece în absența receptorului LIN-12 (Notch), ambele devin celule de ancorare .

Totuși , situația este mai complexă decât pare la prima vedere. Inițial, celulele vecine sunt echivalente din punct de vedere al dezvoltării (Figura 18.24). Fiecare sintetizează niveluri scăzute ale proteinei de semnalizare Notch (codificată de *gena lag-2) și , de asemenea,* ale proteinei receptor Notch . Din întâmplare,

o celulă ajunge să producă mai mult semnal (proteina LAG-2). Acest lucru determină celula vecină să își crească producția de receptor (proteina LIN-12X). Celula care produce mai mult receptor devine celula precursoare uterină, iar cealaltă celulă care produce mai mult semnal devine celula de ancorare. Factorul esențial în acest prim ciclu de interacțiune celulă-celulă este echilibrul dintre produsul genei de semnalizare LAG-2 (Delta) și produsul genei LIN-12 (Notch).

Un al doilea și un al treilea ciclu de interacțiuni celulă-celulă duc la formarea vulvei în sine (Figura 18*25). Al doilea ciclu implică celula de ancorare (situată în gonadă) și șase dintre celulele sale vecine (numite celule precursoare) situate în piele. Celulele precursoare se numesc celule P3.pa și P8.p și sunt cunoscute colectiv sub numele de celule Pn.p. Soarta fiecărei celule Pn.p este determinată de poziția sa relativă față de celula de ancorare.

Celula ancoră sintetizează proteina de semnalizare LIN-3, care este recepționată și procesată de trei celule precursoare Pn.p adiacente (Pn.p 5-7). Celula cea mai apropiată de celula ancoră (de obicei Pn.p 0) se diferențiază în celula precursoare vulvară primară, iar celulele adiacente (Pn.p 5 și 7) se diferențiază în celule precursoare secundare. Odată ce celula vulvară primară este stabilită, într -o a treia rundă de interacțiuni celulă-celulă, o proteină de semnalizare secretată de celula vulvară primară activează gena /IH- *12* în celulele secundare și le împiedică să se diferențieze în celule precursoare primare. Celulele precursoare rămase (Pn.p 3, 4 și 8) nu primesc niciun semnal de la celula ancoră și se diferențiază în celule ale pielii.

18,8

Moartea celulară programată este necesară pentru dezvoltarea normală.

În timpul dezvoltării normale, moartea celulară programată este un eveniment controlat genetic care ajută la modelarea țesuturilor și organelor. Un exemplu binecunoscut de moarte celulară programată este formarea degetelor la membrele vertebratelor. Acest proces necesită moartea celulelor interdigitale (Figura 18.26), un proces numit apoptoză. Genele care controlează apoptoza au fost identificate pentru prima dată la *C. elegans.* La C. elegans, ca și în

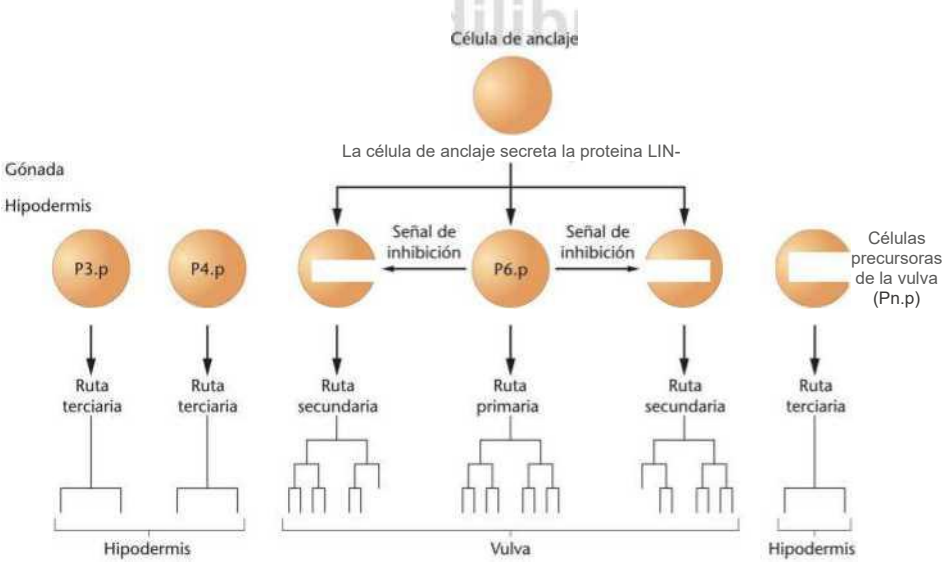


FIGURA 18.25 Determinación del linaje celular en la formación de la vulva de C. *elegans.* Tres células precursoras de la vulva (células Pn.p) reciben una señal de la célula de anclaje en forma de proteína. LIN-3. La célula más cercana a la célula de anclaje se convierte en célula precursora primaria de la vulva y las células adyacentes se convienen en células precursoras secundarias. Las células primarias secretan una señal que activa el gen /w-12 en las células secundarias, evitando que estas se conviertan en células primarias. Las células precursoras flanqueantes, que no reciben ninguna señal de la célula de anclaje, se convierten en células de la piel (hipodermis), en lugar de en células de la vulva.

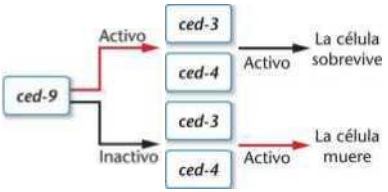


FIGURA 18.26, Calea genetică ce controlează moartea celulară la C. *elegans,* în care gena *ced-9* acționează ca un comutator binar. Dacă *ced-9* este activă, aceasta reprimă acțiunea *ced-3 și ced-4, iar* celula trăiește. Dacă *ced-9* este inactivă, *ced-3 și ced-4* sunt exprimate, inițiind o cascadă de evenimente care duc la moartea celulară, un proces cunoscut sub numele de apoptoză.

La multe alte organisme, dezvoltarea normală se bazează pe moartea celulară programată . Numărul de celule care mor în timpul dezvoltării nematodelor este întotdeauna același : 131 din 1.090 la hermafroditi și 147 din 1.178 la masculi. În plus, stadiul de dezvoltare în care o anumită celulă moare și identitatea celulelor care mor sunt întotdeauna aceleași.

Analiza mutațională indică faptul că, deși moartea celulară programată are loc în celule din linii celulare diferite, toate celulele utilizează aceeași cale genetică. La C. *elegans,* cel puțin 15 gene sunt implicate în moartea celulară . Aceste gene controlează patru procese: (1) decizii privind moartea celulară, (2) implementarea acestor decizii, (3) fagocitoza celulelor moarte și (4) degradarea - resturilor celulare din celulele care le fagocitează.

Expresia genelor *ced-3* și *ced-4* este necesară pentru executarea programului de moarte celulară; mutațiile care inactivează oricare dintre aceste două gene duc la supraviețuirea celulelor care în mod normal ar muri. Expresia genelor *ced-3 și ced-4* este controlată de *ced-9.* Mutațiile cu câștig de funcție care duc la exprimarea constitutivă sau supraexprimarea genei *ced-9* previn moartea celulară . În schimb, mutanții cu pierdere de funcție care inactivează *ced-9* duc la letalitate embrionară, ceea ce înseamnă că *ced-9* acționează prin inactivarea *genelor ced-3* și *ced-4* în celulele supraviețuitoare (Figura 18.26). Cu alte cuvinte, *ced-9* este o *genă de comutare binară* pentru apoptoză. Celulele care exprimă *ced-9* supraviețuiesc, iar cele care nu mor.

ced-9 a genei C. *elegans* are un omolog uman, *bcl-2,* o proto-oncogenă ce controlează apoptoza. Mutațiile care supraexprimă *bcl-2* previn moartea celulelor care în mod normal ar muri. La om, supraexprimarea *bcl-2* se găsește în limfomul folicular, o formă de cancer. Transferul unei gene umane clonate *bcl-2 în embrioni de C. elegans* care sunt mutanți nuli *ced-9* induce apoptoza, indicând faptul că nematodele și mamiferele au o cale comună pentru acest proces. Astfel, omologia dintre moleculele și mecanismele utilizate de speciile din arborele filogenetic, ilustrată pe parcursul acestui capitol, se extinde și la moleculele și mecanismele necesare pentru moartea celulară.

GENÉTICA, TECNOLOGÍA Y SOCIEDAD

Războiul celulelor stem

Cercetarea celulelor stem poate fi cel mai controversat domeniu de cercetare de la apariția tehnologiei ADN -ului recombinant în anii 1970. Deși cercetarea celulelor stem este în centrul declarațiilor prezidențiale , al campaniilor publicitare majore din mass-media și al dezbaterilor etice , puțini oameni o înțeleg suficient de bine pentru a cântări argumentele pro și contra.

Celulele stem sunt celule primitive care se replică la nesfârșit și au capacitatea de a se diferenția în celule cu funcții specializate, cum ar fi cele găsite în inimă , creier, ficat și țesutul muscular. Celulele stem sunt originea tuturor celulelor care formează aproximativ 200 de tipuri diferite de țesuturi din corpul nostru. Unele tipuri de celule stem sunt definite ca totipotente . Aceasta înseamnă că au capacitatea de a se diferenția în orice tip de celulă matură din organism. Alte tipuri de celule stem sunt *pluripotente,* adică se pot diferenția în oricare dintre un număr mic de tipuri de celule mature.

În urmă cu relativ puțini ani, mai multe grupuri de cercetare au izolat și cultivat celule stem pluripotente umane. Aceste celule rămân nediferențiate și cresc la nesfârșit în

plăci de cultură . Atunci când sunt tratate cu factori de creștere sau hormoni , aceste celule stem pluripotente se diferențiază în celule care au caracteristici ale celulelor nervoase, osoase, renale, hepatice, cardiace sau pancreatice .

Faptul că celulele stem pluripotente cresc prolific în cultură și se diferențiază în celule mai specializate a generat un mare entuziasm . Unii prevăd o zi în care celulele stem ar putea fi o cornucopie din care s-ar putea recolta un număr nelimitat de celule specializate pentru a înlocui celulele deteriorate din țesuturile bolnave. Prin urmare, celulele stem ar putea fi utilizate pentru a trata boala Parkinson , diabetul de tip 1 , bolile cardiace cronice , boala Alzheimer și leziunile măduvei spinării . Unii prevăd că celulele stem vor fi modificate genetic pentru a elimina rejecția în transplanturi sau pentru a produce produse genetice specifice, corectând astfel defectele genetice sau tratând cancerul . Entuziasmul din jurul terapiilor cu celule stem a fost alimentat de publicațiile experimentelor pe animale de mare succes. De exemplu , șoarecii cu leziuni ale măduvei spinării și - au recăpătat mobilitatea și controlul intestinelor și vezicii urinare după ce au fost injectați cu celule stem umane . Atât susținătorii , cât și criticii cercetării celulelor stem sunt de acord că terapiile cu celule stem ar putea fi revoluționare . Așadar, de ce toată controversa din jurul cercetării celulelor stem ?

Răspunsul la această întrebare constă în originea celulelor stem pluripotente . Până în prezent, toate liniile de celule stem - pluripotente au fost obținute din blastociste embrionare în vârstă de cinci zile . În acest stadiu , blastocistele constau din 50 până la 150 de celule, majoritatea acestora urmând să se dezvolte în cele din urmă în țesuturi placentare și de susținere a embrionului incipient . Masa celulară internă a blastocistului constă din aproximativ 30 până la 40 de celule stem pluripotente care vor da naștere tuturor țesuturilor embrionului. Fertilizarea clinică *in vitro* dezvoltă ovulele fertilizate până la stadiul de blastocist de cinci zile înainte de transferul lor în uter. Liniile de celule stem embrionare (ESC) sunt obținute prin extragerea masei celulare interne din blastociste în vârstă de cinci zile și creșterea celulelor în vase de cultură .

Faptul că embrionii sunt distruși în stadiile lor incipiente pentru a stabili linii celulare umane CME îi îngrijorează pe cei care cred că embrionii, înainte de implantare, sunt persoane cu drepturi; cu toate acestea, acest lucru nu îi îngrijorează pe cei care cred că acești embrioni sunt prea primitivi pentru a avea statut uman. Ambele tabere ale dezbaterii ridică întrebări fundamentale despre ce constituie o ființă umană .

Recent, oamenii de știință au dezvoltat mai multe tipuri de celule stem pluripotente fără a utiliza embrioni . Unul dintre cele mai promițătoare tipuri, cunoscut sub numele de *celule stem pluripotente* induse (*iPSC*), utilizează celule somatice adulte ca sursă de celule stem pluripotente . Pentru a prepara iPSC-uri, oamenii de știință izolează celule somatice, cum ar fi celulele pielii , și le infectează cu retrovirusuri special concepute care se integrează în ADN-ul celulei . Aceste retrovirusuri conțin mai multe gene umane clonate care codifică produse responsabile de transformarea celulelor somatice în celule stem pluripotente nemuritoare .

Dezvoltarea liniilor celulare iPS a generat un entuziasm reînnoit pentru cercetarea celulelor stem , deoarece aceste celule nu ridică problemele etice asociate cu utilizarea embrionilor umani . În plus, ele pot deveni o sursă de linii celulare stem pluripotente specifice pacientului , care pot fi utilizate pentru transplant fără a declanșa respingerea imună .

În prezent , nu se știe dacă celulele stem de orice fel vor fi atât de miraculoase pe cât s-a prezis ; cu toate acestea, dacă cercetarea celulelor stem progresează în ritmul rapid actual, nu va trebui să așteptăm mult pentru a ne rezolva îndoielile.

Rândul tău

Acordați -vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a încerca să înțelegeți tehnologia și controversele din jurul cercetării celulelor stem .

1. În opinia dumneavoastră, care sunt problemele etice și științifice care încă înconjoară cercetarea celulelor stem ? Au fost aceste probleme rezolvate prin noile metode de creare a celulelor stem pluripotente?

Puteți găsi descrieri ale unora dintre noile metode de generare a liniilor de celule stem pluripotente , precum și problemele etice legate de aceste metode, în Kastenberg, ZJ și Odorico J. S. 2008. *Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells*. **Transplantation Rev. 22: 215-222.**

2. Care sunt legile actuale privind cercetarea celulelor stem în țara dumneavoastră și cum se compară aceste legi cu reglementările din alte națiuni sau regiuni?

Un bun punct de plecare pentru informații despre legile privind cercetarea celulelor stem în Statele Unite este site-ul web al Institutului Național de Sănătate. (http://stemcells.nih.gov).

3. Ești pentru sau împotriva cercetării celulelor stem? De ce sau de ce nu?

Un sondaj online interesant, împreună cu argumente în favoarea sau împotriva cercetării celulelor stem, este oferit de Public Broadcasting Corporation. http://www.pbs.org/wgbh/nova/body/stem-cell-poll.html .

4. dumneavoastră , care este cea mai semnificativă dezvoltare din ultimii ani în domeniul cercetării celulelor stem?

Câteva idei pentru a începe căutarea sunt: site-ul PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db-PubMed) și *pagina cu celule stem din versiunea online a ziarului The New York Times. (* http://topics.nytimes.com/top/news/health/diseasescondition-sandhealthtopics/stemcells).

STUDIU DE CAZ | Un picior și celălalt

La om, grupul de gene homeotice *HOXD* joacă un rol esențial în dezvoltarea membrelor . Într -o familie numeroasă , 16 din 36 de membri au exprimat una dintre cele două deformități ale piciorului moștenite dominant, cunoscute sub numele de talus vertical congenital (CVT) și picior cavus (CMT). Un individ din această familie avea un picior cu CVT și un altul cu CMT. Analiza genomică a identificat o singură mutație nonsens în *gena HOXD10,* rezultând o substituție a unui singur aminoacid în domeniul homeotic al factorului de transcripție codificat. Această regiune este crucială pentru contactul și legarea la genele țintă controlate de această proteină. Toți membrii familiei cu deformități ale piciorului au fost heterozigoți; toți membrii neafectați au fost homozigoți pentru alela normală.

1. Având în vedere că indivizii heterozigoți afectați au o alelă normală a *genei HOXD10,* cum ar putea o mutație dominantă într-o genă care codifică un factor de transcripție să ducă la o malformație de dezvoltare?
2. Cum pot două afecțiuni clinic distincte să rezulte din aceeași mutație?
3. Ce putem învăța despre controlul proceselor de dezvoltare înțelegând cum funcționează această mutație?

Puncte de rezumat

1. Genetica dezvoltării, care explorează mecanismele prin care informația genetică controlează dezvoltarea și diferențierea , este unul dintre principalele domenii de studiu în biologie . Geneticienii investighează acest subiect prin izolarea mutațiilor de dezvoltare și identificarea genelor implicate în procesul de dezvoltare .
2. În timpul embriogenezei , activitatea unor gene specifice este controlată de mediul intern al celulei , inclusiv de componentele situate în citoplasmă. La muște , reglarea evenimentelor timpurii este mediată de citoplasma maternă , care influențează apoi expresia genelor zigotice . Pe măsură ce dezvoltarea progresează, atât mediul intern, cât și cel extern al celulei sunt modificate de prezența produselor genetice timpurii și de comunicarea cu alte celule.
3. La *Drosophila,* atât cercetările genetice, cât și cele moleculare au - confirmat că oul conține informații care specifică planul corporal al larvei și al adultului.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

4. Analize genetice extinse ale dezvoltării embrionare la *Drosophila* au condus la identificarea genelor cu efect matern ale căror produse stabilesc axa anteroposterioară a embrionului. Mai mult , aceste gene cu efect matern activează grupurile de gene de clivaj zigotic , inițiind o cascadă de reglare genică ce culminează cu determinarea identității segmentului de către genele selectoare homeotice . Aceleași seturi de gene controlează aspecte ale dezvoltării embrionare la toate animalele bilaterale, inclusiv la oameni .
5. Formarea florilor la *Arabidopsis* este controlată de gene homeotice , dar aceste seturi de gene aparțin unei familii de gene diferite de genele homeotice ale *Drosophila* și ale altor animale.
6. În C. *elegans,* Linia strict determinată a fiecărei celule permite biologilor specializați în dezvoltare să studieze semnalizarea celulă-celulă necesară organogenezei și să determine ce gene sunt necesare pentru procesul normal de moarte celulară programată.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. În mucegaiul *Dictyostelium,* dovezile experimentale sugerează că AMPc joacă un rol central în programul de dezvoltare care duce la formarea sporilor. Genele care codifică receptorul de suprafață celulară pentru AMPc au fost clonate, iar secvența de aminoacizi a componentelor proteice este cunoscută. Pentru a forma structuri reproductive , celulele individuale libere se agregă și apoi se diferențiază în două tipuri de celule: celule protosporale și celule protopedunculare. Când celulele se agregă, ele secretă valuri sau fluctuații de AMPc pentru a promova agregarea celulară și apoi secretă continuu AMPc pentru a activa genele din celulele agregate în stadiile ulterioare de dezvoltare. S-a propus că AMPc controlează interacțiunile celulă-celulă și expresia genelor. Este important să se testeze această ipoteză folosind diverse tehnici experimentale. Ce abordări diferite ați putea proiecta pentru a testa această ipoteză și ce sisteme experimentale specifice ați utiliza pentru a le testa?

Soluție. Două dintre cele mai puternice forme de analiză în biologie implică utilizarea analogilor biochimici (sau inhibitorilor) pentru a bloca în mod previzibil transcripția genelor sau acțiunea produselor genetice și utilizarea mutațiilor pentru a modifica genele și produsele acestora. Aceste două abordări pot fi utilizate pentru a investiga rolul AMPc în

programul de dezvoltare *Dictyostelium* . În primul rând , compușii chimici înrudiți cu AMPc, cum ar fi GTP și GDP, pot fi utilizați pentru a testa dacă au vreun efect asupra proceselor controlate de AMPc. Într-adevăr, atât GTP, cât și GDP scad afinitatea receptorilor de suprafață celulară pentru AMPc, blocând efectiv acțiunea AMPc.

Analiza mutațională poate fi utilizată pentru a diseca componentele sistemului receptor cAMP. O metodă implică utilizarea transformării cu gene de tip sălbatic pentru a restabili funcția mutantă. În mod similar, deoarece genele pentru proteinele receptor au fost donate, este posibil să se construiască mutanți cu modificări cunoscute ale componentelor proteice și să se introducă în celule pentru a le evalua efectele.

2. La arici de mare, dezvoltarea timpurie poate avea loc chiar și în prezența actinomicinei D, care inhibă sinteza ARN-ului. Cu toate acestea, dacă actinomicina D este prezentă în timpul dezvoltării timpurii, dar este îndepărtată câteva ore mai târziu, dezvoltarea este oprită . De fapt, dacă actinomicina D este prezentă doar între a șasea și a unsprezecea oră de dezvoltare, evenimentele care au loc în mod normal la a cincisprezecea oră sunt oprite. Ce concluzii se pot trage cu privire la rolul transcripției genelor între a șasea și a cincisprezecea oră?

   Soluție. ARNm-urile materne sunt prezente în oul de arici de mare fertilizat . Prin urmare , o dezvoltare considerabilă poate avea loc fără transcrierea genomului embrionului . Deoarece dezvoltarea după 15 ore este inhibată de tratamentul anterior cu actinomicină D, se pare că transcrierile genomului embrionului sunt necesare pentru a iniția sau a menține aceste evenimente. Această transcriere trebuie să aibă loc între a șasea și a cincisprezecea oră de dezvoltare.

3. Dacă ar fi posibil să se introducă una dintre genele *homeotice* ale *Drosophilei* Într -un embrion homozigot de Arabidopsis , *s-ar* putea aștepta ca vreuna dintre genele Drosophila să înlocuiască o genă homeotică de înflorire *?* Va anula (salva) nonotipul mutant de *Arabidopsis* ? De ce da sau de ce nu ?

   Soluție. Genele homeotice ale *speciei Drosophila* aparțin *familiei de gene Hox,* în timp ce genele homeotice ale speciei *Arabidopsis* aparțin familiei de proteine MADS box. Ambele familii de gene sunt prezente atât la *Drosophila* , cât și *la Arabidopsis, dar au dezvoltat* funcții distincte în regnurile animal și vegetal . Prin urmare, este foarte puțin probabil ca o genă *Hox să...* Drosophila transferată *a* salvat fenotipul unui mutant din cutia MADS , dar doar un experiment real ar putea confirma acest lucru.

Problemas *y* preguntas para la discusión

DE CUM ȘTIM (

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care expresia genelor diferențiale ghidează procesele care duc de la ovulul fertilizat la individul adult. Pe parcursul acestui proces, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) De unde știm câte gene controlează dezvoltarea unui organism precum *Drosophila?*
   (b) Ce dovezi experimentale avem la dispoziție pentru a demonstra că gradienții moleculari din ouă controlează dezvoltarea ?
   (c) De unde știm că un program genetic care specifică o parte a corpului poate fi modificat ?
   (d) Ce dovezi genetice arată că semnalele chimice schimbate de celule controlează evenimentele de dezvoltare?
   (e) Cum știm dacă sistemul de semnalizare în dezvoltarea vulvei acționează doar asupra celulelor adiacente sau folosește semnale care pot afecta celule mai îndepărtate ?

2. Distingeți cu atenție termenii *diferențiere* și *terminare* . Ce fenomen apare inițial în timpul dezvoltării?
3. Nuclei din aproape orice sursă pot fi injectați în ovocite *de Xenopus* . Studiile au arătat că acești nuclei rămân activi în ceea ce privește transcripția și traducerea. *Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, vizitați www.masteringgenetics.com* În ce fel poate fi util un astfel de sistem experimental în studiile genetice ale dezvoltării ?
4. Distingeți între stadiul blastodermal sincițial și stadiul blastodermal celular în *embriogeneza Drosophila.*
5. (a) Ce sunt genele cu efect matern ? (b) Când se formează produsele genetice ale acestor gene și unde sunt localizate? (c) Ce aspecte ale dezvoltării controlează genele cu efect matern? (d) Care este fenotipul mutațiilor cu efect matern ?
6. (a) Ce sunt genele zigotice și când se produc produsele lor genetice ? (b) Care este fenotipul asociat cu mutațiile genetice zigotice ? Genotipul matern conține gene zigotice?
7. Enumerați principalele clase de gene zigotice . Care este funcția fiecăreia dintre aceste clase de gene?
8. S -a demonstrat experimental că orice nucleu situat în citoplasma polară a polului posterior al oului de *Drosophila* Se va diferenția într- o celulă germinală . Dacă citoplasma polară este transplantată la capătul anterior al ovulului, chiar înainte de fertilizare, ce s-ar întâmpla cu nucleii care au migrat către această citoplasmă a polului anterior ?
9. Cum poți determina dacă o anumită genă este transcrisă în diferite tipuri de celule?
10. Dacă se observă că o anumită genă este transcrisă în timpul dezvoltării , cum se poate determina dacă expresia acestei gene este sub control transcripțional sau translațional?
11. Ce sunt genele *Hox ?* Ce proprietăți au în comun? Sunt toate genele homeotice *gene Hox?*

12. Mutația homeotică *Antennapedia* Acest lucru are ca rezultat o mutație *Drosophila* care are picioare în loc de antene și este o mutație dominantă de tip câștig de funcție. Care sunt proprietățile unor astfel de mutații ? Cum transformă gena *Antennapedia* antena într- un picior?
13. Mutația homeotică *aristapedia fără spin (ss ª) Mutația* la *Drosophi are* ca rezultat formarea unei structuri tarsale miniaturale (de obicei o parte a membrului) la capătul antenei . Ce informații oferă această mutație (ss") despre rolul genelor în timpul determinării sexului ?
14. Embriogeneza și oncogeneza (formarea cancerului) au în comun mai multe caracteristici, inclusiv proliferarea celulară , apoptoza, migrarea și invazia celulară, formarea de noi vase de sânge și activitatea genică diferențială . Celulele embrionare sunt relativ nediferențiate, iar celulele canceroase par a fi nediferențiate sau dediferențiate. Expresia genelor homeotice direcționează dezvoltarea timpurie , iar expresia mutantă duce la pierderea stării diferențiate sau la o identitate celulară alternativă . M.T. Lewis (2000. Breast *Can. Res.* 2:158-69) a sugerat că cancerele de sân pot apărea din cauza modificărilor expresiei genelor homeotice. Când a examinat 11 astfel de gene în cancere , opt au fost subexprimate și trei au fost supraexprimate în raport cu grupul de control. Având în vedere ceea ce știți despre genele homeotice , care este probabilitatea ca acestea să fie implicate în oncogeneză?
15. Dezvoltarea timpurie depinde de interrelația temporală și spațială dintre materialele și ARNm-urile furnizate de mamă și de inițierea expresiei genelor în zigot. ARNm- urile codificate matern trebuie produse, localizate și degradate (Surdej și Jacobs-Lorena, 1998. *Mol. Cell Biol.).* 18:2892-2900). De exemplu, transcripția genei *bicoid** , care determină polaritatea anteroposterioară la Drosophila *,* este maternă. ARNm -ul este sintetizat în ovar de către celulele doică și apoi transportat la ovocit, unde se localizează la capătul anterior. După depunerea ouălor , ARNm-ul *bicoid este tradus* , iar proteina bicoidă instabilă formează un gradient de concentrație descrescător de la capătul anterior al embrionului. Până la începutul gastrulației , ARNm-ul bicoid *a* fost degradat . Să luăm în considerare două modele pentru a explica degradarea ARNm *-ului bicoid:* (1) degradarea poate rezulta din semnale ARNm interne (model intrinsec) sau (2) degradarea poate rezulta din poziția ARNm-urilor în ovul (model extrinsec). Experimental, cum ar putea fi distinse aceste două modele?
16. La **Arabidopsis*,* dezvoltarea florilor este controlată de grupuri de gene homeotice. Câte clase ale acestor gene există și ce structuri se formează prin exprimarea lor individuală sau combinată?
17. Formarea celulelor germinale la Drosophila *și* la mulți *alți* embrioni depinde de poziția lor în cadrul embrionului și de expunerea lor la determinanți citoplasmatici localizați. Nucleii expuși citoplasmei la capătul posterior al ouălor de Drosophila (polul plasmatic) formează celule care se dezvoltă în celule germinale sub îndrumarea componentelor derivate din mamă. R. Amikura și colab . (2001. Proc . Nat . *Acad. Sci. (USA)* 98:9133-38) au descoperit în mod constant ribozomi mitocondriali în afara mitocondriilor în plasma germinală a embrionilor de *Drosophila* și au postulat că aceștia sunt implicați intim în specificarea celulelor germinale . Dacă ați studia acest fenomen, ce ați dori să știți despre activitatea acestor ribozomi?
18. Unul dintre cele mai interesante aspecte ale dezvoltării timpurii este remodelarea ciclului celular, care trece de la diviziuni celulare rapide , practic lipsite de fazele G1 și G2, la cicluri celulare mai lente, cu faze G1 și G2 măsurabile și puncte de control. În timpul remodelării, ARNm-urile materne care specifică ciclinele sunt deadenilate, iar genele zigotice sunt activate pentru a produce cicline. Audic și colab. (2001. *Mol Cell Biol.* 21:1662-71) sugerează că deadenilarea necesită transcripția genelor zigotice. Desenați o diagramă care include cele mai semnificative aspecte ale acestor descoperiri.

Problemas extrapicantes

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

19. La *Drosophila,* au fost identificate mai multe gene care controlează - expresia genelor *Hox* . Unul dintre acești mutanți homozigoți este gena „ extra *sex combs",* în care o parte a capului și toate segmentele toracice și abdominale se dezvoltă ca ultim segment abdominal. Cu alte cuvinte, toate segmentele afectate se dezvoltă ca segmente posterioare. Ce vă spune acest fenotip despre care grup de gene *Hox este controlat de* gena *„ extra sex combs "?*
20. Gena *apteros a speciei* Drosophila codifică o proteină necesară pentru modelarea și creșterea aripilor . De asemenea, se știe că are un rol în dezvoltarea nervilor, fertilitate *și* viabilitate . Atunci când au fost utilizate gene umane și de șoarece , ale căror produse proteice seamănă foarte mult cu *cele ale speciei apteros ,* Pentru a genera o *Drosophila transgenică (Rincón-Limas et* al. *Proc. Nat. Acad.* Sci.[USA] 96:2165-70), o Fenotipul mutant *a fost apteros. În plus,* modelele de expresie la nivelul întregului corp la *Drosophila* transgenică au fost similare cu cele ale apterosului normal. (a) Care este semnificația termenului „ salvat " în acest *context* ? (b) Ce indică aceste rezultate despre natura moleculară a dezvoltării?
21. Genele florale homeotice ale *Arabidopsis* Acestea aparțin familiei de gene MADS box , în timp ce la Drosophila , genele homeotice aparțin familiei de gene homeobox . Atât la *Arabidopsis* , cât și la Drosophila , Membrii familiei de gene *Polycomb* controlează expresia acestor gene homeotice divergente. Cum controlează genele *Polycomb* această expresie ? expresia a două grupuri atât de diferite de gene homeotice?
22. Identificarea și caracterizarea genelor care controlează determinarea sexului a fost un alt obiectiv al cercetătorilor care lucrează cu C. *elegans.* Ca și în *Drosophila,* în acest organism sexul este determinat de raportul dintre cromozomii X și autozomi. Un mascul sălbatic diploid are un cromozom X, iar un hermafrodit sălbatic diploid are doi cromozomi X. Au fost identificate multe mutații diferite care afectează determinarea sexului . Mutațiile cu pierdere a funcției în gena numită her - *1* determină dezvoltarea unui nematod XO ca hermafrodit și nu au niciun efect asupra dezvoltării nematodelor XX . (Adică , nematodele XX sunt hermafrodite normale.) În schimb ,

mutațiile cu pierdere a funcției într-o genă numită *tra-1* determină dezvoltarea unui nematod XX ca mascul. Deduceți, din aceste informații, rolurile acestor gene în determinarea sexului la indivizii de tip sălbatic.

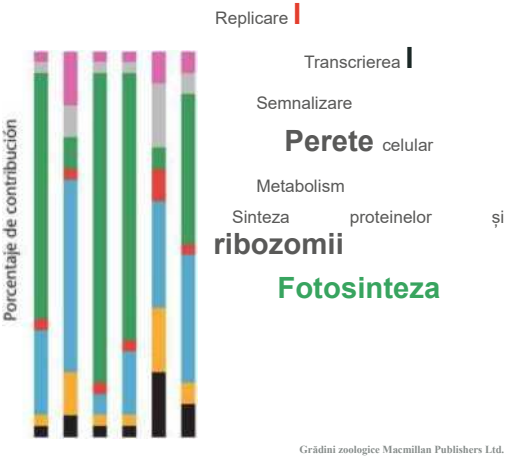
23. Pe baza informațiilor din Problema 22 și a analizei fenotipurilor tulpinilor mutante simple și duble, a fost generat un model de determinare a sexului la C. elegans . Acest model propune ca gena *her-1* Controlează determinarea sexului prin stabilirea nivelului de activitate al *genei tra-1*, care la rândul ei controlează expresia genelor implicate în generarea diferitelor țesuturi cu dimorfism sexual . Având în vedere aceste informații , (a) produsul genei *her-1 are* un efect negativ sau pozitiv asupra activității genei *tra-1?* (b) Care ar fi fenotipul mutantului dublu *tra-1, her-1 ?*

24. Rezultatele unui test de expresie genică pe cip ADN în diferite categorii importante din punct de vedere al dezvoltării (țesuturi și organe) la organismul model Arabidopsis thaliana *(Schmid et al., 2005) sunt prezentate* mai jos . Activitățile genice relative sunt prezentate pe axa y, în timp ce axa x prezintă diferite tipuri de țesuturi.

(a) Sunt modelele de expresie genică în mod rezonabil în concordanță cu ceea ce era așteptat?

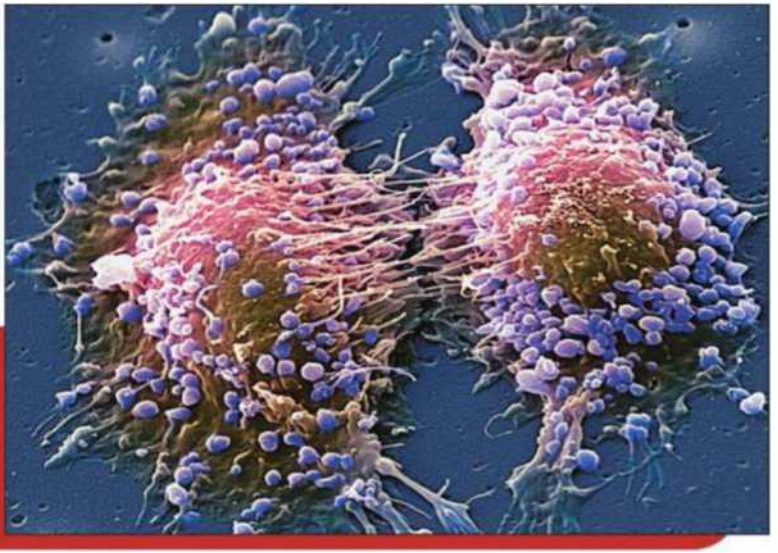
(b) Programul general de dezvoltare al plantelor diferă de cel al animalelor, prin faptul că plantele se dezvoltă continuu , cu noi organe adăugate pe parcursul ciclului lor. Cum ajută un astfel de program de dezvoltare la explicarea expresiei genelor fotosintetice în flori și semințe?

(c) De obicei, se studiază o singură genă sau un număr mic de gene - pentru a determina impactul lor asupra dezvoltării. Aici, o analiză la nivelul întregului genom dezvăluie expresia unor clase largi care conțin multe gene distincte. Cum ne poate ajuta o tehnică cuprinzătoare ca aceasta să ne îmbunătățim înțelegerea rolului genelor în dezvoltare?



Grădini zoologice Macmillan Publishers Ltd.

19



Cancerul și reglarea ciclului celular

CONCEPTE CAPITOL

Cancerul este un grup de boli genetice care afectează fundamental aspecte ale funcției celulare, cum ar fi repararea ADN -ului , reglarea ciclului celular, apoptoza și transducția semnalului .

Majoritatea mutațiilor care cauzează cancer apar în celulele somatice ; doar aproximativ 1% dintre tipurile de cancer au o componentă ereditară .

►► Mutațiile genelor legate de cancer duc la o proliferare anormală și la pierderea controlului asupra modului în care celulele se răspândesc și invadează țesuturile adiacente.

►► Dezvoltarea cancerului este un proces în mai multe etape care necesită mutații în genele care controlează multe aspecte ale proliferării celulare și metastazelor .

►► Celulele canceroase prezintă niveluri ridicate de instabilitate genomică, ceea ce duce la acumularea de mutații multiple în genele legate de cancer.

►► Efectele epigenetice, cum ar fi metilarea ADN-ului și modificările histonei, pot juca un rol semnificativ în dezvoltarea cancerelor.

proto -oncogenelor și genelor supresoare tumorale contribuie la dezvoltarea cancerelor.

►► Virusurile oncogene introduc oncogene în celulele infectate și stimulează proliferarea celulară.

►► Există agenți de mediu care contribuie la apariția

cancerului prin deteriorarea ADN-ului.

■ Cancerul este principala cauză de deces în țară

Sesiuni occidentale. Afectează persoane de toate vârstele, iar una din trei persoane va primi un diagnostic de cancer la un moment dat în viață. Peste un milion de cazuri de cancer sunt diagnosticate în fiecare an în Statele Unite, iar peste 500.000 de oameni mor din cauza acestei boli.

În ultimii 30 de ani, oamenii de știință au descoperit că cancerul este o boală genetică la nivel de celule somatice, caracterizată prin prezența unor produse genetice derivate din gene mutate sau exprimate anormal. Efectele combinate ale numeroaselor produse genetice anormale duc la creșterea și răspândirea necontrolată a celulelor canceroase. Deși unele gene canceroase mutate pot fi moștenite, majoritatea își au originea în celulele somatice, care apoi se divid și formează tumori. Finalizarea Proiectului Genomului Uman și numeroase studii de secvențiere rapidă a ADN-ului la scară largă au deschis calea către o multitudine de informații noi despre mutațiile care determină o celulă să devină canceroasă. Această nouă înțelegere a geneticii cancerului duce, de asemenea, la noi terapii genice direcționate, dintre care unele intră acum în studii clinice. Unii oameni de știință prevăd că, în următorii 25 de ani, terapiile genice vor înlocui chimioterapia.

Scopul acestui capitol este de a evidenția cunoștințele actuale despre natura și cauzele cancerului. După cum vom vedea, cancerul este o boală genetică care apare din acumularea de mutații în genele care controlează multe aspecte de bază ale funcției celulare. Vom examina relația dintre gene și cancer și vom lua în considerare rolurile pe care le joacă mutațiile, modificările cromozomiale, epigenetica și factorii de mediu în dezvoltarea cancerului.

19.1

Cancerul este o boală genetică la nivelul celulelor somatice.

■

Poate cea mai importantă descoperire în înțelegerea cauzelor cancerului a fost conștientizarea faptului că este o boală genetică. Alterările genomice asociate cu cancerul variază de la substituții de nucleotide individuale la rearanjări cromozomiale la scară largă , amplificări și deleții (Figura 19.1). Cu toate acestea, spre deosebire de alte boli genetice, cancerul este cauzat de mutații care apar - predominant în celulele somatice. Aproximativ

FIGURA 19.1 (a) Cariotipul spectral al unei celule normale, (b) Cariotipul unei celule canceroase care prezintă translocații, deleții și aneuploidii, trăsături caracteristice ale celulelor canceroase .

Doar 1% dintre cazurile de cancer sunt asociate cu mutații germinale, care cresc susceptibilitatea unei persoane la anumite tipuri de cancer. O altă diferență importantă între cancer și alte boli

netice este că, de obicei, cancerul nu apare dintr-o singură mutație, ci mai degrabă din acumularea de mutații în mai multe gene, până la 6 până la 12 mutații. Mutațiile care duc la cancer afectează multiple funcții celulare, inclusiv repararea daunelor ADN-ului, diviziunea celulară, apoptoza , diferențierea celulară, comportamentul migrator și contactele celulă-celulă.

Ce este cancerul?

Clinic, cancerul este definit ca un număr mare de boli complexe, până la o sută, care se comportă diferit în funcție de tipurile de celule din care provin. Cancerele variază în ceea ce privește vârsta de debut, rata de creștere, invazivitatea, prognosticul și răspunsul la tratament. Cu toate acestea, la nivel molecular, toate cancerele prezintă

caracteristici comune care le permit să fie grupate într-o familie.

Toate celulele canceroase au două proprietăți fundamentale în comun: (1) creșterea și diviziunea celulară anormală (proliferare) și (2) defecte ale restricțiilor normale care împiedică celulele să se răspândească și să invadeze alte părți ale corpului (metastaze). În celulele normale , aceste funcții sunt strict controlate de gene care sunt exprimate la momentul și locul potrivit. În celulele canceroase, aceste gene sunt mutate sau exprimate necorespunzător.

Această combinație de proliferare celulară necontrolată și răspândire metastatică este ceea ce face ca celulele canceroase să fie atât de periculoase. Atunci când o singură celulă pierde controlul genetic asupra creșterii sale, aceasta se poate transforma într-o masă multicelulară, o tumoare benignă. Adesea, tumorile de acest tip pot fi îndepărtate chirurgical și, în general, nu provoacă daune grave. Cu toate acestea, dacă celulele tumorale dobândesc și capacitatea de a-și pierde coeziunea, acestea intră în fluxul sanguin, invadează alte țesuturi și formează tumori secundare (metastaze), devenind - maligne. Tumorile maligne sunt adesea dificil de tratat și pot pune viața în pericol . După cum vom vedea mai târziu în acest capitol, există mulți pași și mutații genetice care pot transforma o tumoare benignă într-una malignă periculoasă.

Originea clonală a celulelor canceroase

Deși tumorile maligne pot conține miliarde de celule și pot invada și crește în numeroase părți ale corpului, toate celulele canceroase din tumorile primare și secundare sunt clonale, ceea ce înseamnă că provin dintr-o celulă ancestrală comună care a acumulat mutații specifice. Acest concept este important pentru înțelegerea cauzelor moleculare ale cancerului și a implicațiilor sale pentru diagnostic.

Numeroase date susțin conceptul de clonalitate a cancerului . De exemplu, translocațiile cromozomiale reciproce sunt caracteristice multor tipuri de cancer, cum ar fi leucemiile și limfoamele (două tipuri de cancer care implică leucocitele). Celulele canceroase de la pacienții cu limfom Burkitt prezintă translocații reciproce între - cromozomul 8 (cu puncte de ruptură de translocație în sau în apropierea genei *c-myc*) și cromozomii 2, 14 și 22 (cu puncte de ruptură de translocație în sau în apropierea genelor imunoglobulinei). Fiecare pacient cu limfom Burkitt are puncte de ruptură unice în secvențele de ADN ale genelor *c-myc* și imunoglobulinei; cu toate acestea, toate limfocitele de la un singur pacient conțin exact aceleași puncte de ruptură de translocație. Acest lucru demonstrează că toate celulele canceroase din fiecare caz de limfom Bur -Kitt provin dintr -o singură celulă și că această celulă transmite această aberație genetică urmașilor săi .

O altă demonstrație a faptului că celulele canceroase sunt clonale este modelul lor de inactivare a cromozomului X. Așa cum am explicat în Capitolul 7, femelele umane sunt mozaicuri , unele dintre celulele cărora conțin cromozomul X patern inactivat, în timp ce altele au cromozomul X matern inactivat . Inactivarea cromozomului X are loc la începutul dezvoltării și se întâmplă aleatoriu. Toate celulele canceroase dintr-o tumoră, fie că este vorba de tumora primară sau metastatică a aceleiași femei, conțin același cromozom X inactivat. Acest lucru susține conceptul că toate celulele canceroase ale unui pacient provin dintr -o celulă ancestrală comună .

Ipoteza celulelor stem canceroase

Un concept legat de originea clonală a celulelor canceroase este cel al celulei stem canceroase. Mulți oameni de știință cred astăzi că tumorile sunt compuse dintr-un amestec de celule, multe dintre ele nu proliferează . Cele care proliferează și dau naștere tuturor celulelor tumorii sunt cunoscute sub numele de celule stem canceroase . Celulele stem sunt celule care au capacitatea de a se autoreînnoi - un proces în care celula stem se divide inegal , creând o celulă fiică care continuă procesul de diferențiere pentru a deveni un tip de celulă matură și o altă celulă fiică care rămâne o celulă stem (subiectul celulelor stem este discutat și în Capitolul 18 și Capitolul Special 4). Ipoteza celulelor stem canceroase se opune modelului aleatoriu stochastic , care prezice că toate celulele dintr-o tumoră au potențialul de a forma o nouă tumoră.

Deși oamenii de știință continuă să dezbată activ ipoteza existenței celulelor stem canceroase, se acumulează dovezi că aceste celule stem canceroase există, cel puțin în unele tumori . - Celulele stem canceroase au fost identificate în leucemii , precum și în tumorile solide ale creierului , sânului , colonului , ovarelor , pancreasului și prostatei . Încă nu este clar ce fracțiune din fiecare tumoră este compusă din celule stem canceroase . De exemplu, leucemiile mieloide acute la om conțin mai puțin de o celulă stem canceroasă la 10.000 de celule. În schimb , tumorile solide pot conține până la 40% celule stem canceroase .

Oamenii de știință sunt, de asemenea, incerti cu privire la originea celulelor stem canceroase. Acestea pot proveni din celule stem adulte normale dintr -un țesut sau pot fi create din celule mai diferențiate care dobândesc proprietăți asemănătoare celulelor stem după acumularea a numeroase mutații .

Cancerul este un proces în mai multe etape care necesită mutații multiple. Deși știm că cancerul este o boală genetică inițiată de mutații care duc la proliferarea celulară necontrolată și la metastaze, o singură mutație nu este suficientă pentru a transforma o celulă normală într-o celulă malignă · formatoare de tumori (tumorigenică). Dacă ar fi așa, cancerul ar fi mult mai frecvent decât este în prezent . La oameni, mutațiile apar spontan cu o rată de aproximativ 10^{6}. Mutațiile apar per genă și per diviziune celulară, în principal datorită ratelor inerente de eroare în replicarea ADN-ului . Deoarece aproximativ 10^{16} diviziuni celulare au loc în corpul uman în timpul vieții unei persoane, aceasta ar putea experimenta până la 10^{-16} mutații per genă undeva în corpul său. Cu toate acestea, doar una din trei persoane va dezvolta cancer.

Faptul că apariția cancerului este legată de vârstă este o altă indicație a faptului că cancerul se dezvoltă din acumularea diferitelor evenimente mutagene într-o singură celulă. Incidența majorității cancerelor crește exponențial odată cu vârsta (Figura 19.2). Dacă ar fi necesară o singură mutație pentru a converti o celulă normală într-una malignă , incidența cancerului ar fi independentă de vârstă . Această incidență a cancerului legată de vârstă sugerează că sunt necesare multe mutații independente care apar aleatoriu și cu probabilitate scăzută pentru ca o celulă să se transforme într- o celulă canceroasă malignă. O altă indicație a faptului că cancerul este un proces în mai mulți pași este întârzierea cu care

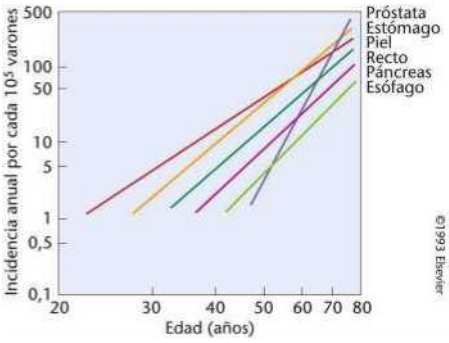


FIGURA 19.2 Incidența majorității cancerelor crește exponențial odată cu vârsta. Acest grafic dublu-logaritmic prezintă rata de incidență în funcție de vârsta pacientului . *(Adaptat după Vogelstein, B. și Kinzler, KW 1993. Natura multi-etapă a cancerului. Trends in Genetics 9: 138–141).*

Există o perioadă de timp între expunerea la un agent cancerigen (un agent care provoacă cancer) și dezvoltarea cancerului. De exemplu, a existat o perioadă de incubație de 5 până la 8 ani între expunerea oamenilor la radiațiile bombelor atomice de la Hiroshima și Nagasaki și apariția leucemiei.

Observația că tipurile de cancer se dezvoltă adesea în etape succesive, pornind de la celule ușor aberante și progresând către celule din ce în ce mai tumorigene și maligne, susține natura în mai multe etape a dezvoltării cancerului. Această natură progresivă a cancerului este ilustrată de dezvoltarea cancerului de colon, așa cum se explică în Secțiunea 19.6.

Fiecare etapă a tumorigenezei (dezvoltarea unei tumori maligne) pare să rezulte din două sau mai multe modificări genetice care eliberează progresiv celulele de sub controlul care în mod normal operează asupra proliferării și malignității. Această observație sugerează că modificările genetice progresive care creează o celulă canceroasă conferă avantaje selective celulei și se propagă prin diviziuni celulare în timpul formării tumorii.

Oamenii de știință aplică acum unele dintre cele mai recente progrese în secvențierea ADN-ului pentru a identifica toate mutațiile somatice care apar în timpul dezvoltării unei celule canceroase. Aceste studii compară secvențele de ADN ale genomurilor celulelor canceroase și ale celulelor normale obținute de la același pacient . Datele din aceste studii dezvăluie că zeci de mii de mutații somatice sunt prezente în celulele canceroase. Cercetătorii cred că doar o mână dintre aceste mutații - numite mutații driver - oferă celulei tumorale un avantaj în ceea ce privește creșterea. Mutațiile rămase pot fi dobândite în timp , probabil ca urmare a nivelurilor crescute de deteriorare a ADN-ului care se acumulează în celulele canceroase, dar aceste mutații nu contribuie direct la genotipul cancerului . Sunt cunoscute sub numele de mutații pasagere. Numărul total de mutații driver care apar în orice tip de cancer rămâne necunoscut. Cu toate acestea, oamenii de știință cred că prezența a mai puțin de o duzină de gene mutate poate fi suficientă pentru a crea o celulă canceroasă.

După cum vom descoperi în secțiunile următoare ale acestui capitol, genele care suferă mutații care duc la cancer (numite oncogene sau gene supresoare tumorale) sunt cele care controlează repararea ADN-ului deteriorat , contactul celulă-celulă și moartea celulară programată. Vom investiga acum fiecare dintre aceste procese fundamentale, genele care le controlează și modul în care mutațiile acestor gene pot duce la cancer.

19.2

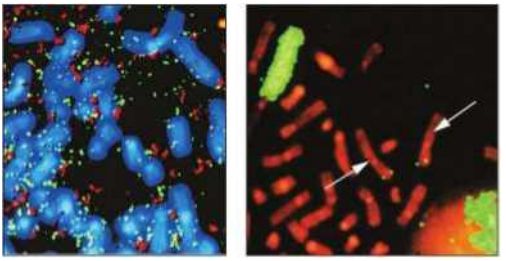
Celulele canceroase conțin defecte genetice care afectează stabilitatea genomică, repararea ADN-ului și modificările cromatinei.

Celulele canceroase prezintă rate de mutație mai mari decât în mod normal, anomalii cromozomiale și instabilitate genomică. Mulți cercetători consideră că defectul fundamental al celulelor canceroase este o alterare a capacității normale a celulei de a repara ADN-ul deteriorat. Această pierdere a integrității genomice duce la o creștere generală a ratei de mutație a tuturor genelor din genom , inclusiv a celor ale căror produse controlează diverse aspecte ale proliferării celulare, morții celulare programate și metastazelor. Nivelul ridicat de instabilitate genomică observat în celulele canceroase este cunoscut sub numele de fenotip mutator. În plus , cercetări recente au arătat că celulele canceroase conțin aberații în tipurile și locațiile modificărilor cromatinei, în special în ceea ce privește modelele de metilare a ADN-ului și a histonei.

Instabilitate genomică și reparare defectuoasă a ADN-ului

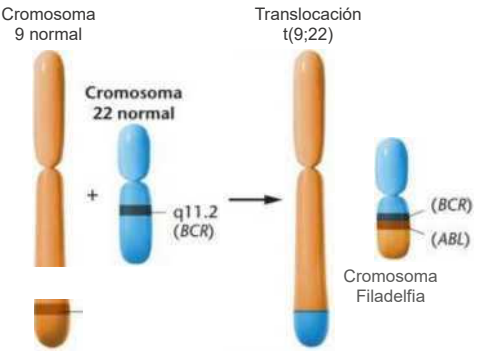
Instabilitatea genomică în celulele canceroase este caracterizată prin prezența unor defecte mari, cum ar fi translocații, aneuploidii, pierderi de cromozomi, amplificare a ADN-ului și deleții cromozomiale (Figurile 19.1 și 19.3). Celulele canceroase cultivate în culturi de laborator prezintă, de asemenea, o mare instabilitate genomică - duplicare, pierdere și translocație de cromozomi sau părți de cromozomi. Celulele canceroase prezintă adesea defecte cromozomiale specifice, care sunt utilizate pentru a diagnostica tipul și stadiul cancerului . De exemplu, leucocitele leucemice de la pacienții cu leucemie mieloidă cronică (LMC) au o translocație specifică în care gena *C-AB1* de pe cromozomul 9 a fost translocată în gena *BCR* de pe cromozomul 22. Această translocație creează o structură cunoscută sub numele de cromozomul Philadelphia (Figura 19.4). Gena *BRC-ABL fuzionată* codifică o proteină himerică BRC-ABL. Proteina ABL normală este o protein kinază care acționează în căile de transducție a semnalului, transferând semnalele factorilor de creștere din mediul extern către nucleu. Proteina BRC-ABL este o moleculă anormală de transducție a semnalului în...

FIGURA 19.4 O translocație reciprocă care implică brațele lungi ale cromozomilor 9 și 22 are ca rezultat formarea unui cromozom caracteristic, cromozomul Philadelphia, care este asociat cu leucemia mieloidă cronică (LMC). Translocația t(9;22) are ca rezultat fuziunea proto -oncogenei *C-ABL* a cromozomului 9 cu gena *BRC* . al cromozomului 22. Această proteină de fuziune este o moleculă hibridă puternică care permite celulelor să scape de controlul ciclului celular , contribuind la dezvoltarea LMC .



(a) Dobles diminutos (b) Región de tinción

FIGURA 19.3 Amplificaciones de ADN en células de neuroblastoma, (a) Dos genes cancerosos *(MYCN* en rojo y *MDM2* en verde) se han amplificado en pequeños fragmentos de ADN que permanecen separados del ADN cromosómico dentro del núcleo. Estas unidades de ADN amplificado se conocen como cromosomas dobles diminutos. Los cromosomas normales están teñidos en color azul, (b) Múltiples copias del gen *MYCN* están amplificadas dentro de una región grande denominada región de tinción heterogénea (en verde). En los extremos de los cromosomas paternos normales se pueden ver copias sencillas del gen *MYCN* como puntos verdes (señalados con flechas blancas). Los cromosomas normales están teñidos en color rojo.



Celulele CML, ceea ce stimulează proliferarea acestor celule chiar și în absența semnalelor externe de creștere.

Continuând conceptul unui fenotip cancer-mutant, mai multe tipuri de cancer ereditare sunt cauzate de defecte ale genelor care controlează repararea ADN-ului . De exemplu, xeroderma pigmentosum (XP) este o boală rară ereditară, caracterizată printr-o sensibilitate extremă la lumina ultravioletă și la alți agenți cancerigeni. Adesea, pacienții cu XP dezvoltă cancer de piele. Celulele pacienților cu XP nu pot efectua repararea prin excizie a nucleotidelor și au mutații în niciuna dintre cele șapte gene ale căror produse genetice sunt necesare pentru a efectua repararea ADN-ului. Celulele XP nu au capacitatea de a repara leziunile ADN-ului, cum ar fi dimerii de timină induși de UV. Capitolul 15 descrie relația dintre XP și genele care controlează repararea prin excizie a nucleotidelor .

Un alt cancer ereditar, cancerul colorectal ereditar nonpolipozic (HNPCC), este, de asemenea, cauzat de mutații ale genelor care controlează repararea ADN-ului. HNPCC este un sindrom autosomal dominant care afectează una din 200 până la 1.000 de persoane. Pacienții cu HNPCC au un risc crescut de a dezvolta cancer de colon, ovarian, uterin și renal. Celulele pacienților cu HNPCC prezintă rate de mutație mai mari decât în mod normal și o instabilitate cromozomială mai mare. Există cel puțin opt gene asociate cu HNPCC, iar patru dintre ele sunt legate de repararea nepotrivirilor de ADN. Inactivarea oricăreia dintre aceste patru gene - *MSH2, MSH6, MLH1* și *MLH3* - duce la o acumulare rapidă de mutații în întregul genom și la dezvoltarea ulterioară a cancerelor colorectale și a altor tipuri de cancer.

Observația că defectele moștenite ale genelor care controlează repararea prin excizie a nucleotidelor și repararea nepotrivirilor de ADN duc la o rată crescută de cancer susține ideea că fenotipul mutatorului este un factor major care contribuie la dezvoltarea cancerului.

Modificări ale cromatinei și epigenetică în cancer

Domeniul epigeneticii cancerului oferă noi perspective asupra geneticii cancerului. Epigenetica este studiul factorilor care afectează expresia genelor , dar nu modifică secvența de nucleotide a ADN-ului. Efectele epigenetice pot fi moștenite de la o celulă de către celulele sale progenitoare și pot fi prezente atât în celulele somatice, cât și în cele germinale. Exemple de modificări epigenetice includ metilarea ADN-ului și modificările histonei, cum ar fi acetilarea și fosforilarea. Modelele genomice și locațiile acestor modificări pot afecta expresia genelor . De exemplu, se consideră că metilarea ADN-ului este responsabilă pentru reducerea la tăcere a genelor asociată cu imprimarea paternă , represia genelor heterocromatice și inactivarea cromozomului X. Efectele factorilor epigenetici asupra expresiei genelor și a tulburărilor ereditare sunt discutate mai detaliat în Capitolul 17 și Capitolul Special 3 .

Celulele canceroase conțin modele alterate de metilare a ADN-ului . În general, există mult mai puțină metilare a ADN-ului în celulele canceroase decât în celulele normale. În același timp, promotorii unor gene sunt hipermetilați în celulele canceroase. Se consideră că aceste modificări reduc represia transcripțională a marii majorități a genelor care ar fi reduse la tăcere în celulele - normale - inclusiv a genelor care cauzează cancer - reprimând simultan transcripția genelor care reglează funcțiile celulare normale, cum ar fi repararea ADN-ului și controlul ciclului celular . Profilurile de metilare a celulelor canceroase sunt utilizate în prezent pentru a ajuta la diagnosticarea tumorilor și la prezicerea progresiei acestora .

Modificările histonei sunt afectate și în celulele canceroase. În aceste celule, genele care codifică histone acetilazele , deacetilazele, metiltransferazele și demetilazele sunt adesea mutate sau exprimate aberant . Numărul mare de anomalii epigenetice din tumori i -a determinat pe unii oameni de știință să speculeze că ar putea exista mai multe defecte epigenetice în celulele canceroase decât mutații genetice. În plus, deoarece modificările epigenetice sunt reversibile, aceasta înseamnă că ar putea fi posibilă tratarea cancerelor folosind terapii epigenetice. Deși domeniul epigeneticii cancerului este încă la început, acesta a furnizat deja informații valoroase despre tumorogeneză, precum și noi aplicații clinice.

ACUM REZOLVĂ ASTA

19.1 În leucemia mieloidă cronică (LMC), celulele sanguine leucemice pot fi distinse de alte celule prin prezența unei proteine hibride BCR-ABL funcționale. Explicați cum această caracteristică oferă o oportunitate de a dezvolta o abordare terapeutică pentru tratarea LMC .

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să ne imaginăm o terapie bazată pe caracteristicile genetice distinctive ale celulelor leucemice cu LMC. Cheia rezolvării acestei probleme este să ne amintim că proteina de fuziune BRC-ABL se găsește numai în leucocitele cu LMC și că această proteină neobișnuită are o funcție specifică despre care se crede că contribuie direct la dezvoltarea LMC. Pentru a vă ajuta să rezolvați problema , puteți afla mai multe despre medicamentul împotriva cancerului Cleevec vizitând http://www.na.nih.gov/newscenter/qandagleevec .*

19.3

Celulele canceroase conțin defecte genetice care afectează reglarea ciclului celular

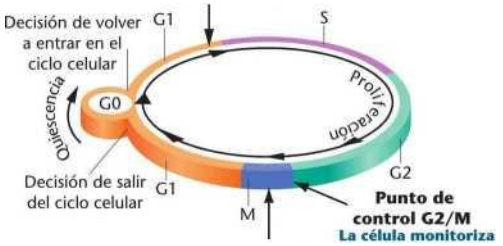
Una dintre aberațiile fundamentale ale tuturor celulelor canceroase este pierderea controlului asupra proliferării celulare. Proliferarea celulară este procesul de creștere și diviziune, esențial pentru dezvoltarea și repararea țesuturilor în toate organismele multicelulare. Deși unele celule, cum ar fi celulele epidermice din piele și precursorii sanguini din măduva osoasă, continuă să crească și să se dividă pe tot parcursul vieții organismului, majoritatea celulelor dintr -un organism adult se află într-o stare diferențiată de latență , nu se divid. Celulele diferențiate sunt cele specializate pentru o funcție specifică, cum ar fi celulele fotoreceptoare din retină sau celulele cardiace din inimă. Celulele neproliferative sunt celulele nervoase, care se divid puțin, dacă nu deloc, chiar și pentru a înlocui țesutul deteriorat . În schimb, multe celule diferențiate, cum ar fi cele din ficat sau rinichi , pot crește și se pot diviza dacă sunt stimulate de semnale extracelulare și factori de creștere . În acest fel, organismele multicelulare pot înlocui țesuturile moarte și deteriorate. Cu toate acestea, creșterea și diferențierea celulară trebuie să fie strict reglementate ; altfel, integritatea organelor și țesuturilor ar fi compromisă de prezența unor tipuri de celule nepotrivite sau a unor cantități incorecte. Reglarea normală a proliferării celulare implică un număr mare de produse genetice care controlează fazele ciclului celular, moartea celulară programată și răspunsul celulei la semnalele externe de creștere. În celulele canceroase, multe dintre genele care controlează aceste funcții sunt mutate sau exprimate aberant, ceea ce duce la o proliferare celulară necontrolată .

În această secțiune vom trece în revistă fazele ciclului celular, unele dintre genele care controlează acest ciclu și modul în care aceste gene, atunci când sunt mutate, duc la cancer.

Ciclul celular și transducția semnalului

Ciclul celular cuprinde evenimentele celulare care au loc între o diviziune celulară și următoarea (Figura 19.5). Etapa interfazică a ciclului celular este intervalul de timp dintre două diviziuni mitotice. În acest timp, celula crește și își replică ADN-ul. În timpul fazei G1 , celula se pregătește pentru sinteza ADN-ului prin acumularea enzimelor și moleculelor necesare pentru replicarea ADN-ului .

Punct de control C1/S
Celula monitorizează dimensiunea și integritatea ADN-ului



Celula monitorizează sinteza și deteriorarea ADN-ului, formarea fusului de nucleotidă și atașarea kinetocorului.
Punctul de control M monitorizează sinteza și deteriorarea ADN-ului.

FIGURA 19.5 Punctele de control și punctele de decizie ale proliferării monitorizează progresul celulei pe parcursul ciclului celular.

Faza G1 este urmată de faza S, în timpul căreia ADN-ul cromozomial al celulei este replicat . În timpul fazei G2, celula continuă să crească și se pregătește pentru diviziune. În timpul fazei M , cromozomii duplicați se condensează, cromozomii surori se separă la poli opuși , iar celula se divide în două . Aceste faze ale ciclului celular au fost , de asemenea, discutate în detaliu în Capitolul 2.

În prima jumătate a fazei G1, celula decide dacă să intre în următorul ciclu celular sau să se retragă din ciclul celular și să rămână latentă. Celulele care se divid continuu nu părăsesc ciclul celular , ci continuă prin fazele G1, S, G2 și M ; cu toate acestea , dacă celula primește semnale pentru a opri creșterea , intră în faza GO a ciclului celular . În timpul GO, celula rămâne activă metabolic , dar nu crește și nu se divide. Majoritatea celulelor diferențiate din organismele multicelulare pot rămâne în această fază GO pe termen nelimitat. Unele , cum ar fi neuronii , nu reintră niciodată în ciclul celular . În schimb, celulele canceroase nu pot intra în GO și repetă ciclul continuu . Rata *lor* ... Rata de proliferare nu este neapărat mai mare decât cea a unei celule proliferante normale ; cu toate acestea, acestea nu pot deveni latente la momentul sau locul potrivit .

Adesea , celulele din GO pot fi stimulate de semnale de creștere externe pentru a reintra în ciclul celular. Aceste semnale sunt transmise celulei prin intermediul unor molecule precum factorii de creștere și hormonii care se leagă de receptorii de la suprafața celulară , care apoi transmit semnalul de la membrana plasmatică la citoplasmă . Procesul de transmitere a semnalelor de creștere din mediul extern la nucleul celular este ...

Aceasta se numește transducție a semnalului. În cele din urmă, transducția semnalului inițiază un program de expresie genică care determină celula să iasă din GO și să reintră în ciclul celular. Celulele canceroase au adesea defecte în căile de transducție a semnalului . Uneori , moleculele anormale de transducție a semnalului trimit continuu semnale de creștere către nucleu, chiar și în absența semnalelor de creștere externe. Un exemplu de transducție anormală a semnalului, datorată mutațiilor din *gena ras, este descris în Secțiunea 19.4.* În plus, celulele maligne pot să nu răspundă la semnalele externe de la celulele vecine, semnale care în mod normal inhibă proliferarea celulară în țesutul matur.

Controlul ciclului celular și punctele de control

În celulele normale, progresia prin ciclul celular este strict reglementată, iar fiecare etapă trebuie finalizată înainte de a putea începe următoarea. Există cel puțin trei puncte de control diferite în ciclul celular, unde celula își examinează echilibrul intern înainte de a trece la etapa următoare. Acestea sunt punctele de control G1/S, G2/M și M (Figura 19.5). La punctul de control G1/S, celula își examinează dimensiunea și determină dacă ADN-ul său a fost deteriorat. Dacă celula nu a atins o dimensiune adecvată sau dacă ADN-ul său este deteriorat, progresia sa prin ciclul celular este oprită până când aceste condiții sunt corectate. Dacă atât dimensiunea celulei, cât și integritatea ADN-ului sunt normale , - celula trece de punctul de control G1/S și intră în faza S. Al doilea punct de control important este G2/M, unde celula își examinează starea fiziologică înainte de a intra în mitoză. Dacă replicarea ADN-ului sau repararea deteriorării ADN-ului nu este completă , ciclul celular se oprește până când aceste procese sunt finalizate. Al treilea punct de control important are loc în timpul mitozei și se numește punctul de control M. Examinează formarea sistemului de fibre fusiforme și atașarea acestor fibre la kinetocorii asociați cu centromerii. Dacă fibrele fusiforme nu s-au format corect sau dacă atașarea la kinetocori este incorectă, mitoza este oprită.

Pe lângă reglarea acestor puncte de control ale ciclului celular, două clase de proteine reglează progresia ciclului celular: ciclinele și kinazele dependente de ciclină (CDK). Celula sintetizează și descompune ciclinele într-un model precis în timpul ciclului celular (Figura 19.6). Când este prezentă o ciclină, aceasta se leagă de o CDK specifică, stimulând activitatea complexului CDK/ciclină. Aceste complexe fosforilează apoi selectiv și activează alte proteine, care la rândul lor fac modificările necesare pentru ca celula să progreseze prin ciclul celular. De exemplu, în faza G1, complexele CDK4Z

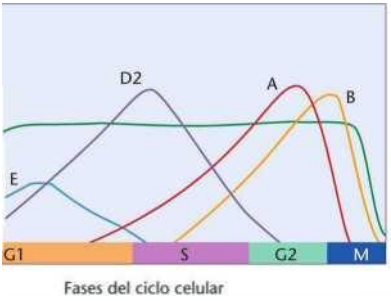


FIGURA 19.6 Momentul exprimării și cantitățile relative de cicline în timpul ciclului celular . Cidina D1 se acumulează la începutul fazei G1 și este exprimată la un nivel constant pe parcursul majorității ciclului celular. Cidina E se acumulează în G1, atinge vârfurile și scade la jumătatea fazei S. Cidina D2 începe să se acumuleze în a doua jumătate a fazei G1, atinge vârfurile imediat după începerea fazei S și apoi scade la începutul fazei G2. Cidina A apare la sfârșitul fazei G1, se acumulează în timpul fazei S, atinge vârfurile la tranziția G2/M și se degradează rapid. Cidina B atinge vârfurile la tranziția G2/M și scade rapid în timpul fazei M.

Ciclina D activează proteinele care stimulează transcripția genelor ale căror produse (cum ar fi ADN polimeraza și ADN ligaza) sunt necesare pentru replicarea ADN-ului în timpul fazei S. Un alt complex CDK/ciclină, complexul CDK1 / ciclină B, fosforilează diverse proteine care stimulează evenimentele mitozei timpurii, cum ar fi degradarea membranei nucleare , condensarea cromozomilor și reorganizarea citoscheletului (Figura 19.7). Cu toate acestea, mitoza poate fi finalizată numai atunci când ciclina B este degradată și fosforilarea proteinelor caracteristică fazei M este inversată. Deși există un număr mare de protein kinaze diferite în celule, doar câteva sunt implicate în reglarea ciclului celular.

Ciclul celular este reglat de interacțiunea genelor ale căror produse promovează sau inhibă diviziunea celulară. Prezența mutațiilor sau expresia greșită a oricăreia dintre genele care controlează ciclul celular poate contribui la dezvoltarea cancerului. De exemplu, dacă genele care controlează punctele de control G1/S sau G2/M sunt mutate, celula poate continua să crească și să se dividă fără a repara daunele ADN-ului. Când aceste celule continuă să se dividă, acumulează mutații în genele ale căror produse controlează proliferarea celulară sau metastaza. În mod similar, dacă genele care controlează progresia prin ciclul celular , cum ar fi cele care codifică ciclinele, sunt exprimate la un moment nepotrivit sau la niveluri incorecte , celula poate crește și se poate diviza continuu și este posibil să nu poată ieși din ciclul celular și să intre în etapa următoare.

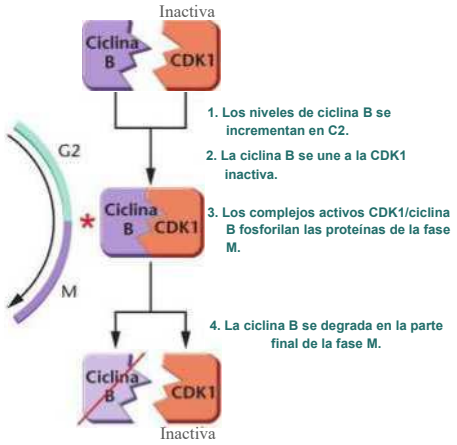

Inactiva
Ciclina B
CDK1
1. Los niveles de ciclina B se incrementan en C2.
G2
2. La ciclina B se une a la CDK1 inactiva.
Ciclina B
CDK1
3. Los complejos activos CDK1/ciclina B fosforilan las proteínas de la fase M.
M
4. La ciclina B se degrada en la parte final de la fase M.
Ciclina B
CDK1
Inactiva

FIGURA 19.7 CDK1 și ciclina B controlează tranziția de la faza G2 la faza M. În faza G2 târzie, ciclina B se acumulează și formează complexe cu molecule CDK1 inactive. Moleculele CDK1 sunt activate în cadrul acestor complexe și adaugă grupări fosfat componentelor celulare. Aceste molecule fosforilate declanșează modificările structurale și biochimice necesare pentru faza M. În faza M târzie, ciclina B este degradată, CDK1 este inactivată, iar fosforilările din faza M sunt inversate.

în GO. Rezultatul în ambele cazuri este că celula pierde controlul asupra proliferării și începe calea spre a deveni canceroasă .

Controlul apoptozei

Așa cum tocmai s-a descris , dacă replicarea sau repararea ADN-ului, sau asamblarea cromozomilor, este defectă , celulele normale își opresc progresia prin ciclul celular până când această afecțiune este corectată. Acest lucru reduce numărul de mutații și anomalii cromozomiale care se acumulează în celulele proliferative. Cu toate acestea, dacă deteriorarea ADN-ului sau a cromozomilor este atât de severă încât nu poate fi reparată, celula poate iniția o a doua linie de apărare - un proces numit apoptoză sau moarte celulară programată. Apoptoza este un proces controlat genetic în care celula se sinucide. Pe lângă rolul său în prevenirea cancerului, apoptoza este inițiată și în timpul dezvoltării normale a organismelor multicelulare pentru a elimina anumite celule care nu contribuie la organismul adult final. Etapele apoptozei sunt aceiași atât pentru celulele deteriorate, cât și pentru celulele eliminate în timpul dezvoltării : ADN-ul nuclear este fragmentat, structurile celulare interne sunt descompuse, iar celula se dizolvă în structuri sferice mici numite corpi apoptotici [Figura 19.8(a)]. În etapa finală , corpii apoptotici sunt înghițiți de celulele fagocitare ale sistemului imunitar. Moleculele responsabile de inițierea apoptozei și digestia componentelor intracelulare sunt un grup de proteaze numite caspaze.

Apoptoza este controlată genetic, prin faptul că reglarea nivelurilor unor produse genetice specifice, cum ar fi Bc112 și BAX [Figura 19.8(b)], poate declanșa sau preveni apoptoza. Prin eliminarea celulelor deteriorate , moartea celulară programată reduce numărul de mutații care sunt transmise generației următoare, inclusiv cele din genele care cauzează cancer . Unele dintre aceleași gene care reglează punctele de control ale ciclului celular pot stimula apoptoza . Aceste gene sunt restricționate în multe tipuri de cancer. Ca urmare a mutației sau inactivării acestor gene legate de punctele de control , celula nu este capabilă să - și repare ADN-ul sau să sufere apoptoză . Această incapacitate duce la acumularea și mai multor mutații în genele care controlează creșterea, diviziunea și metastaza .

19.4

Proto-oncogenele și genele supresoare tumorale sunt modificate în celulele canceroase

În celulele canceroase , există două categorii generale de gene - mutate sau exprimate greșit : proto - oncogene și gene supresoare tumorale (Tabelul 19.1). Proto - oncogenele codifică factori de transcripție care stimulează exprimarea altor gene , molecule de transducție a semnalului care stimulează diviziunea celulară și - regulatori ai ciclului celular care conduc celula prin ciclul celular . Produșii lor sunt importanți pentru funcțiile celulare normale , în special creșterea și diviziunea celulară. Când celulele devin latente și se opresc din diviziune, ele reprimă exprimarea majorității proto-oncogenelor sau modifică activitățile produselor lor. În celulele canceroase, una sau mai multe proto-oncogene sunt alterate, astfel încât activitățile produselor lor nu pot fi reglate normal . Uneori, acest lucru se datorează mutațiilor care au ca rezultat un produs proteic care funcționează anormal . În alte cazuri, proto-oncogenele pot fi supraexprimate sau exprimate la un moment nepotrivit. Dacă o proto-oncogenă este continuu într -o stare „activă", produsul său poate stimula constant celula să se divida . Când o proto-oncogenă este mutată sau exprimată incorect și contribuie la dezvoltarea cancerului, aceasta devine

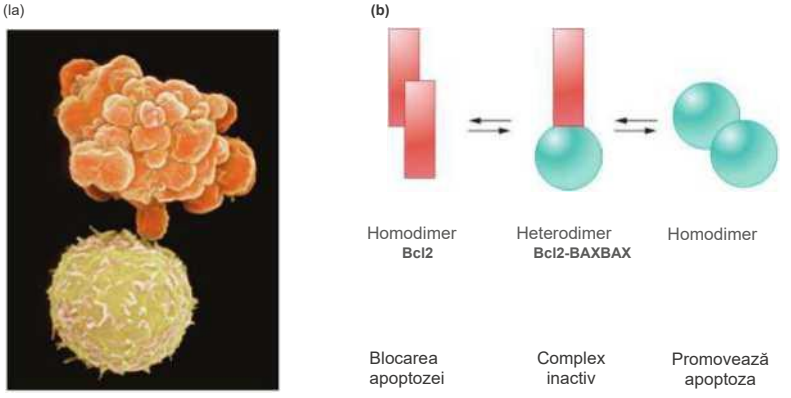


FIGURA 19.8 (a) Leucocite normale (jos) şi leucocite aflate în apoptoză (sus). Corpii apoptotici au aspectul unui ciorchine de struguri pe suprafaţa celulei. (b) Concentraţiile relative ale proteinelor Bcl2 şi BAX reglează apoptoza . Într -o celulă normală, cantităţile de Bcl2 şi BAX sunt echilibrate, formând heterodimeri inactivi. Un exces relativ de Bcl2 duce la formarea de homodimeri Bcl2, care previn apoptoza. Celulele canceroase cu supraexprimare a Bcl2 sunt rezistente la chimioterapie şi radioterapie. Un exces relativ de BAX are ca rezultat homodimeri BAX, care induc apoptoza. În celulele normale, proteina p53 activată induce transcripţia genei *BAX* . şi inhibă gena Bd2 , ceea ce duce la moartea celulară. În multe celule canceroase, pS3 este defectă, împiedicând calea apoptotică să elimine celulele canceroase.

TABELUL 19.1 Unele proto-oncogene şi gene supresoare tumorale

Proto-oncogenă	Funcţie normală Alterare în cancer	Cancere asociate
c-myc	Translocaţie, amplificare, mutaţii punctuale	Limfoame, leucemii, cancer pulmonar, multe tipuri
	Factorul de transcripţie reglează ciclul celular, diferenţierea şi apoptoza	
kit C	Tirozin kinaza, transducţia semnalului Mutaţie	Sarcoame
RARr	Factorul de transcripţie dependent de hormoni, diferenţierea Translocaţii cromozomiale cu gena PML, produs de fuziune	Leucemie promielocitară acută
E6	Oncogena codificată de papilomavirusul uman inactivează p53 Infecţia cu HPV	Cancerul de col uterin
Cydinas	Se leagă de CDK, reglând ciclul celular Amplificarea genelor, supraexprimarea	Plămân, esofag, multe tipuri

Supresoare tumorale	Funcţionare normală	Alterarea în cancer	Cancere asociate
RB1	Puncte de control ale ciclului celular, se leagă de E2F	Mutaţie, deleţie, inactivare prin produse oncogene virale	Retinoblastom, osteosarcom, multe tipuri
APC	Interacţiuni celulă-celulă	Mutaţie	Colorectal, creier, tiroidă
PS3	Reglarea transcripţiei	Mutaţie, deleţie, virus	Multe tipuri
BRCD1, BRCA2	Repararea ADN-ului	Mutaţii punctuale	Cancerele de sân, ovarian şi de prostată

O genă care provoacă cancer se numește oncogenă . Oncogenele sunt proto-oncogene care au suferit o modificare de tip „câștig de funcție”. Prin urmare, o singură mutație sau o expresie greșită a unei proto-oncogene este suficientă pentru a contribui la apariția cancerului. Prin urmare, oncogenele conferă un fenotip dominant al cancerului.

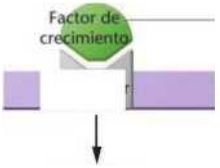
Genele supresoare tumorale sunt acelea ale căror produse reglează în mod normal punctele de control ale ciclului celular sau inițiază apoptoza . În celulele normale , proteinele codificate de genele supresoare tumorale opresc progresia ciclului celular ca răspuns la deteriorarea ADN-ului sau la semnalele de suprimare a creșterii din

mediul extracelular . Atunci când genele supresoare tumorale sunt distruse sau inactive, celulele nu pot răspunde normal la punctele de control ale ciclului celular sau nu sunt capabile să efectueze moartea celulară programată dacă deteriorarea ADN-ului este prea extinsă . Acest lucru duce la acumularea mai multor mutații și la dezvoltarea cancerului. Când ambele alele ale unei gene supresoare tumorale sunt inactive, iar alte modificări ale celulei o mențin în creștere și în diviziune, celulele pot deveni tumorigene.

Următoarele sunt câteva exemple de proto -oncogene și gene supresoare tumorale care, atunci când sunt mutate, contribuie la apariția cancerului. În prezent, sunt cunoscute aproximativ 400 de oncogene și gene supresoare tumorale , iar pe măsură ce cercetările în domeniul cancerului progresează , probabil vor fi descoperite mai multe .

Proto-oncogenele ras

Printre genele cel mai frecvent mutate în tumorile umane se numără cele din familia de gene ras . Aceste gene sunt mutate în peste 30 % din tumorile umane. Familia de gene ras codifică molecule de transducție a semnalului asociate cu membrana celulară, care reglează creșterea și diviziunea celulară. În mod normal, proteinele Ras transmit semnale de la membrana celulară la nucleu, stimulând celula să se dividă ca răspuns la factorii de creștere externi (Figura 19.9). Proteinele Ras alternează între o stare inactivă (deconectată) și una activă (conectată) prin legarea la guanozin difosfat (GDP) sau guanozin trifosfat (GTP). Când o celulă întâlnește un factor de creștere (cum ar fi factorul de creștere derivat din trombocite sau factorul de creștere epidermal), receptorii factorilor de creștere de pe membrana celulară se leagă de aceștia, declanșând autofosforilarea porțiunii citoplasmatice a receptorului factorului de creștere . Acest lucru duce la recrutarea proteinelor cunoscute sub numele de factori de schimb de nucleotide la nivelul membranei - plasmatice . Acești factori de schimb de nucleotide determină Ras să elibereze GDP și să se lege de GTP, activând astfel Ras. Forma activă , legată de GTP, a Ras își trimite apoi semnalele prin cascade



de fosforilări proteice în citoplasmă. Sfârșitul acestor cascade este activarea factorilor de transcripție care stimulează expresia genelor ale căror produse conduc celulele de la starea de inactivitate la ciclul celular . Odată ce Ras a semnalizat nucleul , acesta hidrolizează - GTP în GDP și devine inactiv . Mutațiile care transformă proto - oncogena raí într-o oncogenă împiedică proteina Ras să hidrolizeze GTP în GDP, menținând întotdeauna proteina Ras în conformația sa „activă".

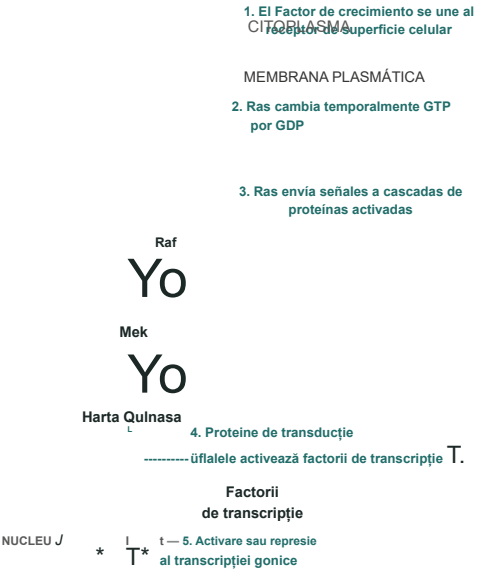


FIGURA 19.9 Calea de transducție a semnalului mediată de Ras.

care stimulează constant celula să se divizeze.

Gena supresoare tumorală *p53*

Gena care suferă cel mai frecvent mutații în cancerele umane, în peste 50 % din totalul cancerelor, este gena p53. Această genă codifică o proteină nucleară ce acționează ca factor de transcripție, reprimând sau stimulând transcripția a peste 50 de gene diferite.

În mod normal, proteina p53 este sintetizată continuu , dar este degradată rapid și, prin urmare, se găsește în celule în cantități foarte mici. Mai mult, proteina p53 este adesea legată de o altă proteină numită MDM2, care are mai multe efecte asupra p53. Prezența MDM2 pe proteina p53 marchează p53 pentru degradare și sechestrează domeniul de activare transcripțională

a p53. De asemenea, previne fosforilările și acetilările care transformă proteina p53 din forma sa inactivă în forma sa activă . Diferite tipuri de evenimente care stresează celulele determină o creștere rapidă a nivelurilor nucleare ale proteinei p53 activate. Acestea includ deteriorarea chimică a ADN-ului, rupturile dublu catenare induse de radiațiile ionizante și prezența intermediarilor de reparare a ADN-ului generați de expunerea celulelor la lumina ultravioletă. Ca răspuns la aceste semnale, MDM2 se disociază de p53, făcând proteina mai stabilă și eliberând domeniul său de activare transcripțională. Creșterea proteinei p53 activate rezultă, de asemenea, din creșterea fosforilării, acetilării și a altor modificări post-transcripționale ale proteinei (Figura 19.10). P53 activat acționează ca un factor de transcripție care stimulează expresia genei MDM2 . *Pe măsură ce* nivelurile de MDM2 cresc, p53 se reasociază cu MDM2, revenind la o stare inactivă și fiind marcat pentru degradare, creând astfel o buclă de feedback negativ.

Proteina p53 inițiază mai multe răspunsuri diferite la deteriorarea ADN-ului, inclusiv oprirea ciclului celular, urmată de repararea ADN-ului și apoptoză dacă ADN-ul nu poate fi reparat. Aceste răspunsuri sunt mediate de p53, care acționează ca un factor de transcripție ce stimulează sau reprimă expresia genelor implicate în fiecare răspuns.

În celulele normale, p53 poate opri ciclul celular la punctele de control G1/S și G2/M, întârziind progresia celulei către faza S. Pentru a opri ciclul celular la punctul de control G1/S, p53 activat stimulează transcripția genei care codifică proteina p21. Proteina p21 inhibă complexul CDK4/ciclină, împiedicând celula să progreseze din faza G1 în faza S. P53 activat reglează, de asemenea, expresia genelor care încetinesc progresia replicării ADN-ului, permițând timp suplimentar pentru repararea ADN-ului în timpul fazei S. Prin reglarea expresiei altor gene, p53 activat poate bloca celulele la punctul de control G2/M dacă apare deteriorarea ADN-ului în timpul fazei S.

P53 activat poate, de asemenea, instrui o celulă deteriorată să se sinucidă prin apoptoză. Aceasta se realizează prin activarea transcripției genei *Bax* și reprimarea expresiei genei *Bcl2* . În celulele normale, proteina BAX se găsește ca heterodimer cu - proteina Bcl2, iar celula este viabilă (Figura 19.8). Cu toate acestea, dacă nivelurile proteinei BAX cresc ca răspuns la stimularea *transcripției genei Bax de către p53,* se formează homodimeri BAX, iar aceștia activează modificările celulare care duc la apoptoză. În celulele canceroase cărora le lipsește p53 funcțional, nivelurile proteinei BAX...

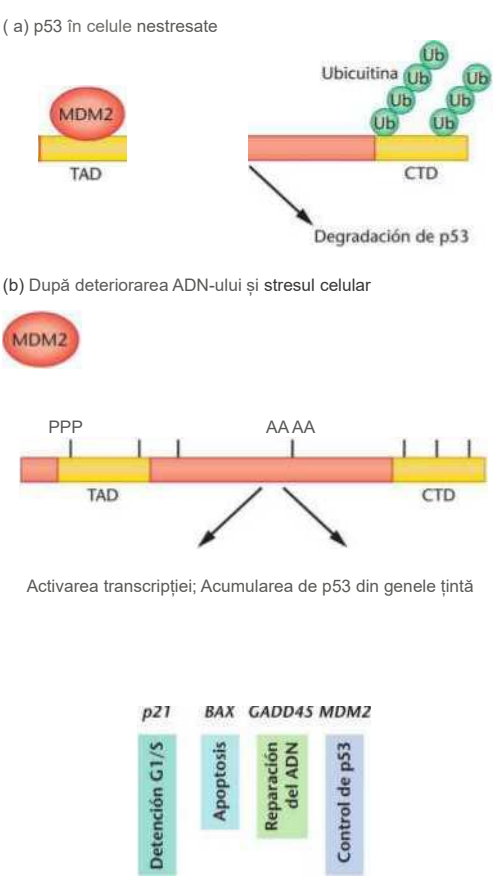


FIGURA 19.10 Etape în reglarea nivelurilor și activității p53. (a) În celulele normale, nestresate, MDM2 menține p53 inactiv și la niveluri scăzute de disponibilitate prin legarea la domeniul de transactivare (TAD) și stimularea adăugării ubiquitinei la reziduurile de lizină din domeniul carboxi-terminal (CTD). Prezența ubiquitinei promovează degradarea p53. (b) În urma diferitelor tipuri de stres celular, inclusiv deteriorarea ADN-ului, kinazele celulare adaugă fosfați (P) la serinele și treoninele din domeniul TAD, provocând disocierea MDM2 și pierderea ulterioară a ubiquitinei. Pe măsură ce nivelurile de p53 cresc în nucleu, histon acetiltransferazele adaugă grupări acetil (A) la lizinele din CTD, crescând stabilitatea p53 și afinitatea sa pentru secvențe specifice de ADN din regiunile promotoare ale genelor țintă. Exemple de gene care sunt stimulate transcripțional de p53 includ *p21* . (ducând la oprirea ciclului celular în G1/S), *BAX* (care stimulează apoptoza), *CADD45* (care contribuie la repararea ADN-ului) și *MDM2* (care readuce p53 la o stare inactivă, cu niveluri scăzute ale acestei proteine).

nu cresc ca răspuns la deteriorarea celulară, deci apoptoza nu poate apărea.

Celulele cărora le lipsește p53 funcțional nu sunt capabile să oprească ciclul celular la punctele de control sau să inducă apoptoza ca răspuns la deteriorarea ADN-ului. Prin urmare, aceste celule progresează prin ciclul celular fără aceste verificări, indiferent de starea ADN-ului lor. Celulele cărora le lipsește p53 au o rată de mutație mai mare și acumulează tipurile de mutații care duc la cancer. Având în vedere importanța genei *p53* pentru integritatea genomică, aceasta este adesea denumită „gardianul genomului".

Gena supresoare tumorală *RB1*

Pierderea sau mutația genei supresoare tumorale RB1 (retinoblastom de tip I) contribuie la dezvoltarea multor tipuri de cancer, inclusiv cancerul de sân, osos, pulmonar și vezică urinară. Gena *RBI* a fost identificată inițial ca urmare a studiilor asupra retinoblastomului , o boală ereditară care determină dezvoltarea tumorilor în ochii copiilor . Retinoblastomul apare la aproximativ 1 din 15.000 de persoane. În forma familială a bolii, indivizii moștenesc o alelă mutată a genei *RBI* și au o șansă de 85% de a dezvolta retinoblastom, precum și o probabilitate crescută de a dezvolta alte tipuri de cancer. Toate celulele somatice ale pacienților cu retinoblastom ereditar conțin o alelă mutată a genei RBI . Cu toate acestea , retinoblastomul se dezvoltă numai atunci când a doua alelă normală a genei *RBI* este pierdută sau mutată în anumite celule ale retinei . La persoanele care nu au această afecțiune ereditară , retinoblastomul este extrem de rar , deoarece necesită apariția a cel puțin două mutații somatice independente în aceeași celulă retiniană pentru ca ambele copii ale genei *RBI* să fie inactivate . (Figura 19.11).

retinoblastomului (pRB) este o proteină supresoare tumorală

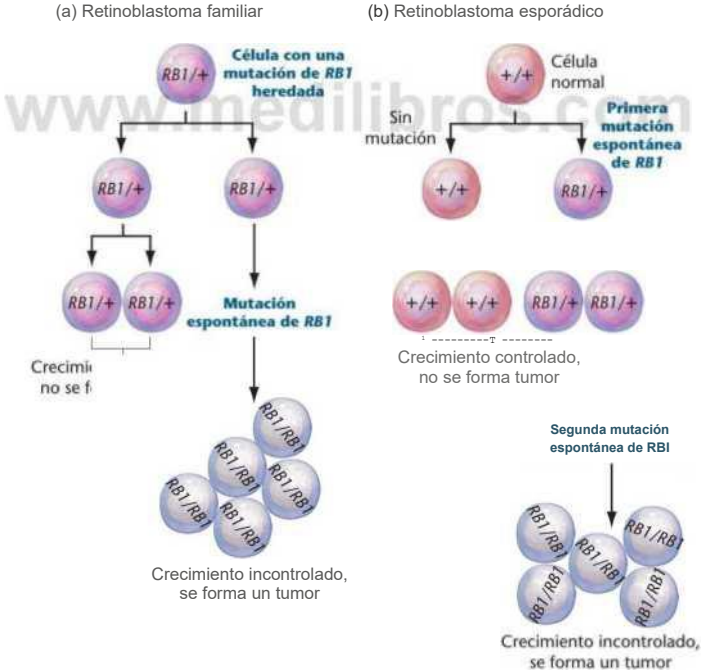


FIGURA 19.11 (a) En el retinoblastoma familiar, una mutación (designada como ***RB1)*** se hereda y está presente en todas las células. Una segunda mutación en el locus del retinoblastoma de cualquier célula retinal contribuye a un crecimiento celular incontrolado y a la formación de un tumor, (b) En el retinoblastoma esporádico, se adquieren dos mutaciones independientes y secuenciales en los alelos del gen retinoblastoma de una misma célula, lo que también conduce a la formación del tumor.

care controlează punctul de control G1/S al ciclului celular. pRB se găsește în nucleul tuturor tipurilor de celule în toate etapele ciclului celular. Cu toate acestea, activitatea sa variază în timpul ciclului celular, în funcție de starea sa de fosforilare. Când celulele se află în faza G0 a ciclului celular, pRB este nefosforilat și se leagă de factori de transcripție precum E2F, inactivându-i (Figura 19.12). Când factorii de creștere stimulează celula, aceasta intră în G1 și se apropie de faza S. În timpul G1, complexul CDK4/ciclină DI fosforilează pRB. pRB fosforilat eliberează apoi proteinele reglatoare de care a fost legat. Când E2F și alte proteine reglatoare sunt eliberate de pRB, acestea pot induce expresia a peste 30 de gene ale căror produse sunt necesare pentru tranziția de la faza G1 la faza S. După ce celula trece prin fazele S, G2 și M, pRB revine la starea sa nefosforilată, se leagă de proteine reglatoare precum E2F și le menține sechestrate până când sunt necesare pentru următorul ciclu celular. În celulele normale latente, prezența proteinei pRB previne intrarea în faza S. În multe celule canceroase, inclusiv în celulele retinoblastomului, ambele copii ale genei *RBI* sunt defecte, inactive sau...

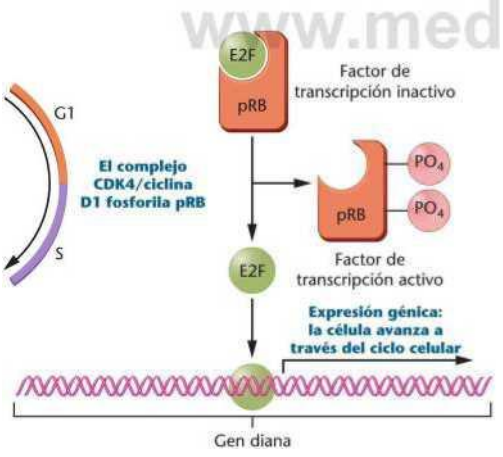


FIGURA 19.12 În timpul fazei G0 și la începutul fazei G1, pRB interacționează cu factorul de transcripție E2F și îl inactivează . Pe măsură ce celula progresează de la faza G1 la faza S, se formează complexul CDK4/cidină D1 și adaugă grupări fosfat la pRB. Pe măsură ce pRB începe să se fosforileze, E2F este eliberat și devine activ transcripțional, permițând celulei să treacă prin faza S. Fosforilarea pRB este tranzitorie; pe măsură ce complexele CDK/cidină se degradează și celula progresează prin ciclul celular până la începutul fazei G1, fosforilarea pRB scade, permițând pRB să se asocieze cu E2F.

ACUM REZOLVĂ ASTA

19.2 Persoanele cu afecțiunea genetică cunoscută sub numele de sindromul Li-Fraumeni moștenesc o copie mutantă a *genei p53*. Aceste persoane prezintă un risc ridicat de a dezvolta o serie de tipuri de cancer, inclusiv cancer de sân, leucemie, cancer osos, tumori adrenocorticale și tumori cerebrale. Explicați cum mutațiile unei singure gene legate de cancer pot duce la o gamă atât de largă de tumori.

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care genele supresoare tumorale reglează creșterea și comportamentul celular. Cheia rezolvării acesteia este de a lua în considerare ce funcții celulare reglează proteina p53 și cum absența p53 ar putea afecta fiecare dintre aceste funcții. Citiți și despre pierderea heterozigoției în Secțiunea 19.6.*

Acestea sunt absente, iar progresia prin ciclul celular nu este reglată.

19,5

Celulele canceroase metastazează și invadează alte țesuturi

Așa cum s-a discutat la începutul acestui capitol, creșterea necontrolată este insuficientă pentru a genera un cancer malign care prezintă un risc care pune viața în pericol . Celulele canceroase trebuie, de asemenea, să dobândească capacitatea de a se desprinde de tumora originală , de a intra în fluxul sanguin sau sistemul limfatic, de a invada țesuturile adiacente și de a se dezvolta în tumori secundare . Pentru a părăsi locul tumorii primare și a invada alte țesuturi, celulele tumorale trebuie să se disocieze de tumora primară și să secrete proteaze care digeră componentele matricei extracelulare și ale membranei bazale, care în mod normal înconjoară și separă țesuturile organismului . Matricea extracelulară și membrana bazală sunt compuse din proteine și carbohidrați. Acestea înconjoară și separă țesuturile organismului , formează scheletul pentru creșterea țesuturilor și inhibă migrarea celulară . Unele tipuri de celule normale au, de asemenea, capacitatea de a invada matricea extracelulară. De exemplu, implantarea unui embrion în peretele uterin în timpul sarcinii necesită migrarea celulară prin matricea extracelulară . În plus , leucocitele ajung la locurile de infecție prin traversarea pereților capilari . Mecanismele de invazie sunt probabil foarte similare în celulele normale și în cele canceroase . Diferența constă în faptul că în celulele normale , capacitatea invazivă este strict reglementată , în timp ce în celulele

tumorale această reglare se pierde.

Odată ce celulele canceroase s-au desprins de tumora primară și au traversat barierele tisulare , acestea intră în fluxul sanguin sau sistemul limfatic și se pot depune în capilarele sanguine ale altor țesuturi. În acel moment, celulele pot trece la o a doua rundă de invazie, pătrunzând în țesut nou și crescând pentru a forma noi tumori (metastatice). Doar un procent mic de celule canceroase circulante - aproximativ 0,01% - supraviețuiesc pentru a se dezvolta tumori metastatice. Alte caracteristici importante ale celulelor metastatice includ creșterea motilității celulare, capacitatea de a stimula formarea de noi vase de sânge și capacitatea de a evita detectarea de către sistemul imunitar al gazdei.

Metastaza este controlată de un număr mare de gene, inclusiv cele care codifică molecule de adeziune celulară, regulatori ai citoscheletului și enzime proteolitice. De exemplu, tumorile epiteliale au niveluri mai mici decât în mod normal ale glicoproteinei E-caderină, care este responsabilă de aderența celulă-celulă în țesuturile normale. În plus, în multe tumori extrem de maligne, unele enzime proteolitice, cum ar fi metaloproteinazele, sunt prezente la niveluri mai mari decât în mod normal. De exemplu, celulele cancerului de sân care metastazează la nivelul oaselor exprimă în mod normal gena pentru metaloproteinaza *MMP1.* Cele care se răspândesc la plămâni supraexprimă genele *MMPI* și *MMP2* . S-a demonstrat că gradul de agresivitate al unei tumori se corelează pozitiv cu nivelul enzimelor proteolitice exprimate de tumoră. În plus, celulele maligne nu sunt sensibile la controalele normale conferite de molecule reglatoare, cum ar fi inhibitorii tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP).

Așa cum genele supresoare tumorale sunt mutate în cancerele primare, genele supresoare ale metastazelor sunt mutate sau blocate în tumorile metastatice. Până în prezent au fost identificate mai puțin de o duzină dintre aceste gene supresoare ale metastazelor, dar toate par să afecteze creșterea și dezvoltarea tumorilor metastatice, mai degrabă decât tumora primară. Un exemplu este proteina CD82, codificată de *gena CD82.* Această proteină inhibă în mod normal funcțiile legate de metastaze , cum ar fi invazivitatea și motilitatea celulară. Face acest lucru prin interacțiunea directă cu proteinele implicate în aceste funcții. În tumorile metastatice, expresia *CD82* este redusă sau absentă. Expresia *CD82* și a altor gene supresoare ale metastazelor este redusă prin mecanisme epigenetice , mai degrabă decât prin mutație. Această observație oferă speranța că cercetătorii ar putea fi capabili să dezvolte terapii anti-metastaze care vizează direct reducerea la tăcere epigenetică a genelor supresoare ale metastazelor.

19,6

Predispoziția la unele tipuri de cancer poate fi ereditară.

Deși marea majoritate a cancerelor umane sunt sporadice , o mică parte (între 1 și 2 %) au o componentă familială sau ereditară. În prezent , sunt cunoscute aproximativ 50 de tipuri de cancere ereditare (Tabelul 19.2).

Majoritatea alelelor de susceptibilitate la cancer moștenite , deși transmise într-o manieră mendeliană dominantă , nu sunt suficiente singure pentru a stimula dezvoltarea cancerului . Cel puțin o altă mutație somatică în cealaltă copie a genei este necesară pentru ca celula să avanseze spre tumorigeneză . În plus, mutațiile din alte gene sunt *, în general, necesare și pentru exprimarea completă a fenotipului canceros. Așa cum am menționat anterior, mutațiile moștenite în gena* RB1 predispun indivizii la dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer . Deși celulele somatice normale ale acestor pacienți sunt heterozigote pentru mutația RB1 , celulele lor tumorale *conțin* mutații în ambele copii ale genei. Fenomenul mutației tumorale a celei de-a doua alele , de tip sălbatic, se numește pierderea heterozigoției. Deși pierderea heterozigoției este un prim pas esențial pentru exprimarea acestor tipuri de cancer ereditare, sunt necesare alte mutații în alte proto- oncogene și gene supresoare tumorale pentru ca celulele tumorale să devină complet maligne .

Predispoziții ereditare la cancer.

Sindroame de predispoziție tumorală	Cromozom	Gena afectată
Cancerul de sân familial cu debut precoce	17q	*BRCA1*
Polipoza adenomatoasă familială	5q	*APC*
Melanomul familial	9p	*CDKN2*
Sindromul Gorlin	9q 2p	*PTCH1* *MSH2, 6*
Cancer colorectal ereditar non-polipozic		
Sindromul Li-Fraumeni	17p	*p53*
Neoplazie endocrină multiplă, tip 1 Neoplazie endocrină multiplă, tip 2	11q 10q	*MEN1* *RET*
Neurofibromatoză, tip 1	17q	*NF1*
Neurofibromatoză, tip 2	22q	*NF2*
Retinoblastom	13q	*pRb*
Sindromul Von Hippel-Lindau Tumora Wilms	3p 11p	*VHL* *WT1*

Dezvoltarea cancerului de colon ereditar ilustrează cum

TABELUL 19.2

Mutațiile moștenite ale unei alele a unei gene contribuie la o singură etapă în calea către malignitate. Aproximativ 1% din cazurile de cancer de colon rezultă dintr-o predispoziție genetică la un tip de cancer cunoscut sub numele de polipoză adenomatoasă familială (PAF). În PAF, se moștenește o copie mutantă a genei *APC* (polipoză adenomatoasă) , situată pe brațul lung al cromozomului 5. Mutațiile includ deleții , mutații de schimbare a cadrului de citire și mutații punctiforme. Funcția normală a produsului genei *APC* este de a acționa ca un supresor tumoral prin controlul contactelor celulă-celulă și inhibarea creșterii prin interacțiunea cu proteina β-catenină. Prezența unei mutații *APC* heterozigote determină celulele epiteliale din colon să scape parțial de controlul ciclului celular, iar celulele se divid pentru a forma grupuri mici de celule numite polipi sau adenoame . Persoanele heterozigote pentru această afecțiune dezvoltă sute până la mii de polipi în colon și rect la o vârstă fragedă. Deși a doua alelă a genei *APC nu* trebuie neapărat să fie mutată în polipi în această etapă, în majoritatea cazurilor, a doua alelă *APC* devine mutată într-o etapă ulterioară a dezvoltării cancerului. Figura 19.13 prezintă ordinea relativă a mutațiilor în timpul dezvoltării cancerului de colon.

A doua mutație în celulele polipice care poartă o mutație în gena *APC* apare în proto-oncogena *ras.* Combinația de mutații în genele APC și *ras* declanșează dezvoltarea adenoamelor intermediare. Celulele acestor adenoame prezintă defecte în diferențierea celulară normală. În plus, aceste celule vor crește în cultură, iar creșterea lor nu este inhibată de contactul cu alte celule - un proces cunoscut sub numele de transformare. Al treilea pas către malignitate necesită - pierderea funcției ambelor alele ale genei *DCC* (delete în cancerul de colon). Se crede că produsul genei *DCC* este implicat în aderența și diferențierea celulară. Mutațiile în ambele alele *DCC* duc la formarea de adenoame în stadiu avansat, cu proeminențe asemănătoare degetelor (adenom vilos). Când adenoamele în stadiu avansat progresează spre adenoame canceroase, acestea suferă de obicei pierderea funcției genelor p53. Pașii finali către malignitate implică mutații într-un număr necunoscut de gene asociate cu metastazele .

ACUM REZOLVĂ ASTA

19.3 Deși fumul de tutun este responsabil pentru un număr mare de cancere umane, nu toți fumătorii dezvoltă cancer. În mod similar, unele persoane care moștenesc mutații ale genelor supresoare tumorale *p53* și *RB1* nu dezvoltă niciodată cancer. Explicați aceste observații.

SUGESTIE: *Această problemă vă cere să analizați de ce doar unii oameni dezvoltă cancer ca urmare a factorilor de mediu sau a mutațiilor genelor supresoare tumorale. Cheia rezolvării acesteia este de a lua în considerare etapele implicate în dezvoltarea cancerului și seria de funcții anormale ale celulelor canceroase. De asemenea, luați în considerare modul în care genetica poate afecta funcțiile de reparare a ADN-ului.*

19,7

Virușii contribuie la apariția cancerului atât la oameni, cât și la animale.

Virusurile care cauzează cancer la animale au jucat un rol important în căutarea cunoștințelor despre genetica cancerului la oameni. Multe dintre aceste virusuri canceroase animale sunt virusuri ARN cunoscute sub numele de retrovirusuri. La oameni, majoritatea virusurilor care cauzează cancer sunt virusuri ADN .

Pentru a înțelege cum retrovirusurile cauzează cancer la animale

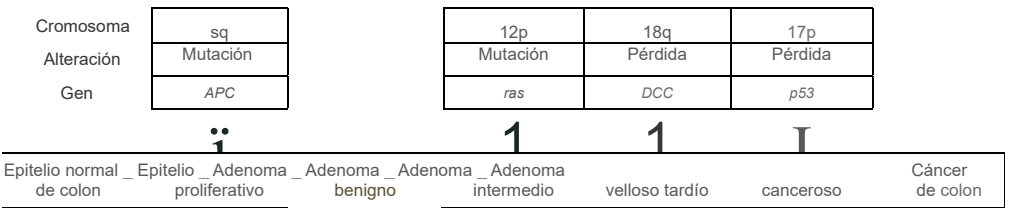


FIGURA 19.13 Modelo de desarrollo en múltiples pasos del cáncer de colon. El primer paso es la pérdida o la inactivación de un alelo del gen *APC* del cromosoma 5. En los casos de FAP, se hereda un alelo mutante *APC*. Mutaciones posteriores en genes de los cromosomas 12, 17 y 18 en células de los adenomas benignos pueden conducirá una transformación maligna cuyo resultado es un cáncer de colon. Aunque las mutaciones en los cromosomas 12, 17 y 18 se producen generalmente en un estadio posterior a las que implican al cromosoma 5, la suma de cambios es más importante que el orden en que se producen.

, este necesar să știm cum se replică aceste virusuri în celule. Când un retrovirus infectează o celulă, enzima transcriptază inversă, care este adusă în celulă chiar de virusul infectant, copiază genomul său ARN în ADN . Această copie a ADN-ului intră apoi în nucleul celulei infectate , unde se integrează aleatoriu în genomul celulei gazdă. Copia ADN integrată a ARN-ului retroviral se numește provirus. ADN-ul proviral conține elemente puternice de promotor și amplificare în secvențele U5 și U3 de la capetele provirusului (Figura 19.14). Promotorul proviral utilizează proteinele de transcripție ale celulei gazdă pentru a direcționa transcripția genelor virale (gag , poi și env) . *Produșii* acestor gene sunt proteinele și genomurile ARN care formează noi particule retrovirale. Deoarece provirusul este integrat în genomul gazdei , acesta se replică împreună cu ADN-ul gazdei în timpul ciclului celular normal. Retrovirusurile pot să nu ucidă celula, dar multe pot continua să folosească celula ca fabrică pentru a replica mai mulți virusuri, care apoi vor infecta celulele vecine.

Un retrovirus poate cauza cancer în trei moduri diferite. În primul rând, ADN-ul proviral se poate integra întâmplător în apropierea uneia dintre proto-oncogenele normale ale celulei. Apoi , promotorii și amplificatorii puternici ai provirusului stimulează niveluri mai ridicate de transcripție a proto-oncogenei sau o fac într-un moment nepotrivit, ducând la stimularea proliferării celulelor gazdă . În al doilea mod, un retrovirus poate lua o copie a unei proto-oncogene gazdă și o poate integra în genomul său (Figura 19.14). Proto-oncogena celulară poate suferi mutații în timpul procesului de transfer către virus sau poate fi exprimată în cantități anormale, deoarece se află sub controlul promotorilor virali. Retrovirusurile care poartă aceste oncogene derivate din celule , cunoscute sub numele de retrovirusuri cu transformare acută, pot infecta celulele normale și le pot transforma în celule tumorale. Studiind numeroase virusuri cu transformare acută la animale , oamenii de știință au identificat zeci de proto-oncogene. În al treilea rând , un retrovirus poate conține o genă virală normală al cărei produs poate fie stimula ciclul celular, fie acționa ca regulator al expresiei genelor atât pentru genele celulare , cât și pentru cele virale . Prin urmare, expresia unei astfel de gene virale poate duce la o creștere celulară inadecvată sau la o expresie anormală a genelor celulare legate de cancer.

Până în prezent, nu au fost identificate la om retrovirusuri cu transformare acută ; cu toate acestea , mai multe retrovirusuri umane , cum ar fi virusul imunodeficienței umane (HIV) și virusul limfotrop T uman (HTLV-1), sunt asociate cu cancerele umane. Se crede că aceste retrovirusuri stimulează dezvoltarea cancerului prin al treilea dintre mecanismele descrise în paragraful anterior.

Virusurile ADN contribuie, de asemenea, la dezvoltarea cancerelor umane în mai multe moduri. Deoarece virusurile constau exclusiv dintr-un genom de acid nucleic înconjurat de un înveliș proteic, acestea trebuie să utilizeze mecanismul biosintetic al celulei pentru a se replica. Pentru a accesa enzimele de sinteză a ADN-ului gazdei , virusurile necesită ca celula gazdă să fie într-o stare de creștere activă . Prin urmare , multe virusuri ADN conțin gene care codifică produse care stimulează ciclul celular . Aceste produse interacționează adesea cu proteinele supresoare tumorale , inactivându-le . Dacă celula gazdă supraviețuiește infecției , poate apărea o pierdere a controlului ciclului celular , ducând la carcinogeneză.

Se crede că, la nivel global, 15% dintre cazurile de cancer sunt asociate cu virusuri, ceea ce face ca infecțiile virale să fie al doilea factor de risc ca importanță pentru dezvoltarea cancerului, după fumat. Principalii factori care contribuie la cancerele induse de virusuri sunt papilomavirusurile (HPV 16 și 18) și virusul limfotrop T uman .

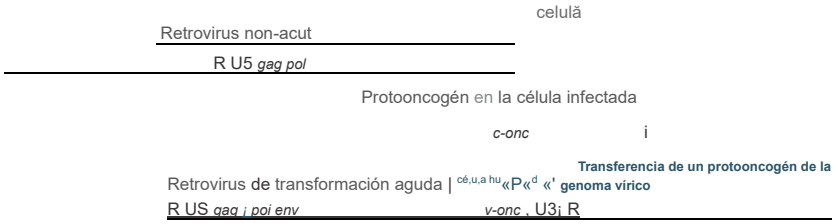

celulă
Retrovirus non-acut
R U5 gag pol
Protooncogén en la célula infectada
c-onc
i
Transferencia de un protooncogén de la genoma vírico
Retrovirus de transformación aguda | cé,u,a hu«P«d «'
R US gag ¡ poi env
v-onc , U3¡ R

FIGURA 19.14 Genoma de un retrovirus típico, en la parte superior del esquema. El genoma contiene repeticiones en los extremos (R), las regiones U5 y U3 que contienen los elementos promotores e intensificadores, y los tres genes principales que codifican las proteínas estructurales del virus (gag y *env)* y la transcriptasa inversa vírica *(poi).* Los transcritos de ARN del genoma vírico completo forman los nuevos genomas víricos. Si el retrovirus adquiere todo o parte de un protooncogén *(c-onc)* de la célula huésped, este gen (que ahora se conoce como *v-onc)* se expresa junto con los genes víricos, lo que conduce a la sobreexpresión o a la expresión inadecuada del gen *v-onc.* El gen *v-onc* también puede adquirir mutaciones que incrementen su capacidad transformante.

+

Genomul virusului care poate infecta, dar nu poate transforma o

(HTLV-1), virusul hepatitei B, herpesvirusul uman 8 și virusul Epstein-Barr. Ca și alți factori de risc pentru cancer, inclusiv predispoziția ereditară la anumite tipuri de cancer, infecția virală singură nu este suficientă pentru a provoca cancer la om. Alți factori, inclusiv deteriorarea ADN-ului sau acumularea de mutații într-una sau mai multe oncogene și gene supresoare tumorale ale unei celule, sunt necesari pentru ca celula să progreseze prin calea în mai multe etape care duce la cancer.

19,8

Agenții de mediu contribuie la apariția cancerelor umane

Orice substanță sau eveniment care deteriorează ADN-ul are potențialul de a fi cancerigen. ADN-ul nereparat sau reparat necorespunzător introduce mutații care, dacă apar într-o proto-oncogenă sau într-o genă supresoare tumorală, pot duce la o reglare anormală a ciclului celular sau la o modificare a controlului asupra apoptozei sau metastazei.

Mediul înconjurător, atât cel natural, cât și cel modificat de oameni, conține abundență de substanțe cancerigene, cum ar fi substanțe chimice, radiații, unele virusuri și infecții cronice. Probabil cel mai important agent cancerigen din mediul nostru este fumul de tutun, care conține cel puțin 60 de substanțe chimice care interacționează cu ADN-ul și provoacă mutații. Epidemiologii estimează că aproximativ 30% din decesele cauzate de cancer la oameni sunt asociate cu fumatul. Fumătorii au un risc de 20 de ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar, o boală care ucide anual peste un milion de oameni din întreaga lume.

Dieta este adesea implicată în dezvoltarea cancerului. Consumul de carne roșie și grăsimi animale este asociat cu unele tipuri de cancer, cum ar fi cancerul de colon, de prostată și de sân. Mecanismele prin care aceste substanțe pot contribui la carcinogeneză nu sunt pe deplin înțelese, dar pot implica stimularea diviziunii celulare mediate de hormoni sau generarea de substanțe chimice cancerigene în timpul gătitului. Alcoolul poate provoca inflamația ficatului și poate contribui la apariția cancerului hepatic.

Deși majoritatea oamenilor percep mediul industrial ca fiind un factor major care contribuie la apariția cancerului, acesta ar putea reprezenta doar un procent mic din totalul cancerelor și numai în circumstanțe speciale. Unii dintre cei mai mutageni și, prin urmare, potențial cei mai cancerigeni, agenți sunt substanțe și procese naturale. De exemplu, aflatoxina, o componentă a unei mucegaiuri care crește pe arahide și porumb, este unul dintre cei mai cunoscuți agenți cancerigeni. Majoritatea produselor cancerigene, cum ar fi nitrozaminele , sunt componente ale substanțelor sintetice și se găsesc în unele tipuri de carne procesată ; cu toate acestea, multe sunt naturale. De exemplu, pesticidele naturale și antibioticele vegetale pot fi cancerigene, iar corpul uman însuși produce agenți alchilanți în mediul acid al intestinului. Cu toate acestea, aceste observații nu diminuează riscul grav de cancer pentru anumite populații expuse la agenți cancerigeni cauzați de om, cum ar fi pesticidele sintetice și azbestul.

Deteriorarea ADN-ului cauzată de radiațiile naturale (raze X și lumină ultravioletă), substanțele naturale din dietă și mediul extern contribuie la majoritatea mutațiilor cauzate de mediu care duc la cancer. În plus, metabolismul normal generează produse finale oxidante care pot deteriora ADN-ul, proteinele și lipidele. Se estimează că organismul uman suferă aproximativ 10.000 de leziuni care dăunează ADN-ului pe zi din cauza acțiunii radicalilor liberi de oxigen . Enzimele de reparare a ADN-ului repară eficient majoritatea acestor daune; cu toate acestea , o parte din aceste daune pot duce la mutații permanente . Procesul de replicare a ADN-ului în sine este mutagen. Prin urmare , substanțe precum factorii de creștere sau hormonii care stimulează diviziunea celulară sunt în cele din urmă mutagene și posibil cancerigene. Inflamația cronică cauzată de infecție stimulează, de asemenea, repararea țesuturilor și diviziunea celulară , rezultând acumularea de leziuni ale ADN-ului în timpul replicării . Aceste mutații pot persista, mai ales dacă punctele de control al ciclului celular sunt afectate din cauza mutațiilor sau a inactivării genelor supresoare tumorale, cum ar fi p53 . și *RB1*.

Atât lumina ultravioletă (UV) , cât și radiațiile ionizante (cum ar fi razele X și razele gamma) induc deteriorarea ADN-ului . Se acceptă faptul că razele UV solare acționează ca inductor al cancerului de piele. Studiile efectuate pe populații expuse la radiații neutronice și gamma au demonstrat în mod clar că radiațiile ionizante sunt cancerigene.

ACUM REZOLVĂ ASTA

19.4 Cancerul poate apărea spontan , dar poate fi indus și ca urmare a factorilor de mediu, cum ar fi expunerea la soare , infecțiile sau fumatul. Dacă vi s-ar cere să ajutați la alocarea resurselor pentru cercetarea cancerului , ce accent ați pune pe cercetarea care vizează găsirea de leacuri pentru cancer , în comparație cu eforturile alocate educației pentru prevenirea cancerului ?

SUGESTIE: *Această problemă ne cere să luăm în considerare rezultatul a două abordări diferite ale cercetării cancerului. Cheia rezolvării acesteia este să ne gândim la ratele relative ale cancerelor spontane și induse de factori de mediu . (O sursă interesantă de informații pe această temă poate fi găsită în Ames, BN și colab., 1995. Cauzele și prevenirea cancerului . Proc . Natl. Acad. Sa. USA 92:5258-65.)*

E

DE GENOMICĂ

Proiectul de Anatomie a Genomului Cancerului (CGAP)

MG ; *Área de estudio. Exploración de la Genómica*

Într -un grup de cercetare *Yo* **Un studiu condus de Dr. Victor - Velculescu de la Universitatea Johns Hopkins a raportat că tipurile de cancer de sân și de colon conțin aproximativ 11 mutații genetice care pot contribui la fenotipul canceros. Grupul de cercetare a analizat 13.023 din cele 21.000 de gene cunoscute din genomul uman, comparând secvențele de ADN ale celulelor normale și ale celulelor canceroase . Majoritatea mutațiilor despre care s-a constatat că sunt specifice celulelor canceroase nu erau cunoscute anterior ca fiind asociate cu cancerul .**

Studiul Dr. Velculescu a fost unul dintre primele pe această temă, parte a proiectului *Atlasul Genomului Cancerului (TCGA)* **, un proiect federal american în valoare de 1,5 miliarde de dolari, conceput pentru a cartografia sistematic genomul uman pentru a găsi gene care prezintă mutații în multe tipuri diferite de cancer. În acest exercițiu, vom explora anumite aspecte ale cercetării Dr. Velculescu consultând informațiile disponibile în baza de date online a Proiectului de Anatomie a Genomului Cancerului (CGAP) . Scopul bazei de date CGAP este de a înțelege profilurile de expresie genică ale celulelor normale, precanceroase - și canceroase. Datele CGAP sunt disponibile tuturor cercetătorilor în domeniul cancerului prin intermediul site-ului său web, la adresa http://cgap.nci.nih.gov/cgap.html .**

■ Exerciții fizice. Cancerul de colon și gena TBX22

O genă despre care grupul de cercetare al Dr. Velculescu a descoperit că prezintă mutații în cancerele de colon - gena TBX22 - nu a fost suspectată anterior că ar contribui la acest cancer. Ce este gena TBX22 și cum credeți că o genă TBX22 mutată contribuie la dezvoltarea cancerului de colon ?

1. **Pentru a începe căutarea de răspunsuri, accesați CGAP la http://cgap.nci.nih.gov/cgap.html .**
2. **Faceți clic pe** *butonul Gene,* **situat în partea de sus a paginii.**
3. **În lista** *Cene* **Tools de pe marginea din stânga , selectați** *Gene Finder* **.**
4. **Selectați** *Homo sapiens* **în caseta de selectare a organismului și introduceți TBX22 în caseta de introducere a identificatorului** *unic* **. Trimiteți interogarea .**
5. **Selectați** *Cene Info* **(obțineți informații) în coloana din dreapta a tabelului.**
6. **Explorați diversele surse de informații disponibile despre TBX22, prin intermediul diverselor linkuri către bazele de date listate pe această pagină.**

Pregătește un scurt raport oral sau scris despre ceea ce ai descoperit în timpul - explorării și despre sursele pe care le-ai folosit pentru a ajunge la concluziile tale despre TBX22 .

SAU

STUDIU DE CAZ | Am crezut că e sigur

O femeie de vârstă mijlocie , care a luat medicamentul Tamoxifen pentru cancerul de sân timp de zece ani, a devenit îngrijorată după ce a văzut o știre cu informații tulburătoare. La unele femei, medicamentul a făcut cancerul mai agresiv și mai predispus la răspândire. Alte femei cu cancer de sân, conform raportului , nu au răspuns deloc la Tamoxifen, iar între 30 și 40 % dintre femeile care au luat medicamentul au devenit în cele din urmă rezistente la chimioterapie . Femeia și - a contactat oncologul pentru a-i pune câteva întrebări:

1. **Cum poate o persoană să reacționeze într-un fel la un tratament pentru cancer , iar alte persoane să reacționeze diferit?**
2. **De ce majoritatea cancerelor devin în cele din urmă rezistente la un anumit medicament chimioterapeutic?**
3. **De ce unele medicamente par sigure la un moment dat și sunt declarate periculoase a doua zi ?**

Puncte de rezumat

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați *zona de studiu la www.masteringgenetics.com*

1. Celulele canceroase au două proprietăți de bază: proliferarea anormală a celulelor și tendința de a se răspândi și de a invada alte părți ale corpului.
2. Cancerele sunt clonale, ceea ce înseamnă că toate celulele dintr-o tumoră provin dintr -o singură celulă care conține diverse mutații.
3. Dezvoltarea cancerului este un proces în mai mulți pași care necesită mutații în diverse gene legate de cancer .
4. Celulele canceroase prezintă o rată ridicată de mutație , anomalii cromozomiale, instabilitate genomică și modele anormale de modificări ale cromatinei.
5. Celulele canceroase prezintă defecte în reglarea progresiei ciclului celular , a punctelor de control ale ciclului celular și a morții celulare programate .
6. Proto -oncogenele sunt gene normale care promovează creșterea și diviziunea celulară . Atunci când proto-oncogenele sunt mutate sau exprimate greșit în celulele canceroase , acestea se numesc oncogene.
7. În mod normal, genele supresoare tumorale reglează punctele de control ale ciclului celular și apoptoza . Atunci când genele supresoare tumorale sunt mutate sau inactivate , celulele nu pot repara deteriorarea ADN-ului. Acest lucru duce la acumularea de mutații care pot cauza cancer.
8. Capacitatea celulelor canceroase de a metastaza necesită defecte în produsele genetice care controlează diverse funcții, cum ar fi aderența celulară, proteoliza și invazia țesuturilor .
9. Mutațiile ereditare ale genelor de susceptibilitate la cancer nu sunt suficiente pentru a inița cancerul. Dezvoltarea cancerelor ereditare necesită mutații somatice în proto-oncogene sau gene supresoare tumorale.
10. Virusurile tumorale contribuie la cancer prin introducerea de oncogene virale , interferarea cu proteinele supresoare tumorale sau modificarea expresiei proto -oncogenelor într-o celulă.
11. Factorii de mediu, cum ar fi substanțele chimice, radiațiile, virușii și infecțiile cronice, contribuie la dezvoltarea cancerului. Cei mai importanți factori de mediu care afectează cancerele umane sunt fumul de tutun, dieta și radiațiile naturale.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. În boli precum retinoblastomul, o mutație germinală într-o alelă a genei RBI poate fi moștenită , provocând o predispoziție autosomal dominantă la dezvoltarea unei tumori oculare. Pentru ca tumora să se dezvolte, este necesară o mutație somatică în a doua copie a genei RBI , indicând faptul că mutația în sine acționează ca o trăsătură recesivă . Având în vedere că prima mutație poate fi moștenită, în ce moduri poate apărea o a doua mutație ?

Soluție. Atunci când analizăm modul în care poate apărea această a doua mutație , trebuie să analizăm diferite tipuri de evenimente mutaționale, inclusiv modificări ale secvenței nucleotidice și evenimente care implică cromozomi întregi sau părți de cromozomi. Retinoblastomul apare atunci când ambele copii ale *locusului RBI sunt pierdute sau inactivate.* Având în vedere acest lucru, trebuie mai întâi să enumerăm fenomenele care pot duce la pierderea sau inactivarea mutațională a unei gene.

O modalitate prin care poate apărea o a doua mutație în *RBI este printr-* o modificare a unui singur nucleotid care transformă alela *RBI* normală rămasă într-o formă mutantă. Această modificare poate avea loc printr- o substituție de nucleotide sau o mutație de schimbare a cadrului de citire cauzată de inserția sau deleția nucleotidelor în timpul replicării . Un al doilea mecanism implică pierderea cromozomului care poartă alela normală . Aceasta s-ar produce în timpul mitozei , rezultând monosomia cromozomului 13, ceea ce ar lăsa copia mutantă a genei ca singura *alelă RBI. Acest* mecanism nu implică neapărat pierderea întregului cromozom; ar putea implica o deleție a brațului lung *(RBI* este localizat la l3q) sau o deleție internă care afectează locusul RBI . și o parte din materialul adiacent ar avea același rezultat. Alternativ, o aberație cromozomială care implică pierderea copiei normale a genei *RBI* ar putea fi urmată de duplicarea cromozomului care poartă alela mutantă. Două copii ale cromozomului 13 ar fi restaurate în celulă , dar alela RBI ar lipsi . Combinația normală nu ar fi prezentă. În cele din urmă, un eveniment de recombinare urmat de segregarea cromozomilor ar putea produce o combinație homozigotă de *alele mutante RBI.*

2. Proto-oncogenele pot deveni oncogene în diferite moduri. În unele cazuri, proto-oncogena însăși este amplificată de sute de ori într-o celulă canceroasă . Acesta este cazul genei *ciclinei DI* . care este amplificată în unele tipuri de cancer. În alte cazuri, proto -oncogena poate suferi mutații în diverse moduri specifice, ducând la modificări ale structurii produsului genetic. Gena *ras este* un exemplu de proto-oncogenă care devine oncogenă după ce suferă mutații punctuale în regiuni specifice ale secvenței sale . Explicați de ce aceste două proto-oncogene *(ciclina DI)* și *ras)* Acestea suferă modificări atât de diferite pentru a deveni oncogene.

Soluție. Primul pas în rezolvarea acestei întrebări este înțelegerea -funcțiilor normale ale acestor proto-oncogene și reflectarea asupra modului în care amplificarea sau mutația ar afecta fiecare dintre aceste funcții.

Proteina ciclină D1 reglează progresia ciclului celular de la faza G1 la faza S prin legarea la CDK4 și activarea acestei kinaze. Complexul ciclină D1/CDK4 fosforilează o serie de proteine , inclusiv pRB, care la rândul său activează alte proteine într -o

cascadă ce are ca rezultat transcrierea genelor ale căror produse sunt necesare pentru replicarea ADN-ului în faza S. Cea mai simplă modalitate de a crește activitatea ciclinei D1 ar fi creșterea numărului de molecule de ciclină D1 disponibile pentru a se lega de moleculele CDK4 endogene ale celulei. Acest lucru poate fi realizat prin diverse mecanisme, inclusiv amplificarea genei ciclinei D1. Pe de altă parte, o mutație punctuală în gena ciclinei D1 ar interfera probabil cu capacitatea proteinei ciclină D1 de a se lega de CDK4; prin urmare, mutațiile acestei gene ar reprima probabil progresia ciclului celular, mai degrabă decât să o stimuleze.

genei *ras este o* proteină de transducție a semnalului care acționează ca un comutator pornit/ oprit ca răspuns la stimularea externă de către factorii de creștere . Aceasta se realizează prin legarea la GTP (starea „activă") sau la GDP (starea „oprit"). Mutațiile oncogene din gena *ras* apar în regiuni specifice care modifică capacitatea proteinei Ras de a schimba GTP cu GDP. Proteinele Ras oncogene sunt blocate în starea „activă", legate de GTP. În acest fel , ele stimulează constant celula să se dividă . O amplificare a genei *ras* Pur și simplu *ar* furniza mai multe molecule din proteina Ras normală , care ar continua să regleze semnalizarea și nesemnalizarea . Prin urmare, amplificarea Ras este mai puțin probabilă . a fost oncogenă.

Problemas y preguntas para la discusión

DE UNDE ȘTIM?

1. În acest capitol, ne-am concentrat pe studiul cancerului ca boală genetică, subliniind relațiile dintre cancer, ciclul celular și deteriorarea ADN-ului , precum și multiplele etape care duc la cancer. Pe parcursul acestui proces , am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale ?
   (a) De unde știm că tumorile maligne apar dintr-o singură celulă care conține mutații?
   (b) De unde știm că dezvoltarea cancerului necesită mai mult de o mutație?
   (c) De unde știm că celulele canceroase conțin defecte în mecanismele de reparare a ADN-ului?
2. Ce evenimente au loc în fiecare etapă a ciclului celular ? Care etapă are cea mai variabilă durată?
3. Unde sunt situate principalele puncte de reglare ale ciclului celular?
4. Enumerați funcțiile kinazelor și cidinelor și descrieți modul în care acestea interacționează între ele pentru a face celulele să progreseze prin ciclul celular.
5. punctul de control G1 ? (b) Cum trec celulele de punctul de control G1 pentru a intra în faza S ?
6. Care este diferența dintre a spune că cancerul este ereditar și a spune că predispoziția la cancer este ereditar?
7. În calitate de consilier genetic, vi se cere să evaluați riscul pentru un cuplu care dorește să aibă copii, dar are antecedente familiale de retinoblastom. În acest caz, atât soțul, cât și soția sunt fenotipic normali, dar soțul are o soră cu retinoblastom familial la ambii ochi. Care este probabilitatea ca acest cuplu să aibă un copil cu retinoblastom ? Există teste care ar putea fi recomandate pentru a ajuta la această evaluare?
8. Ce este apoptoza și în ce circumstanțe celulele trec prin acest proces?

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

9. Definiți genele supresoare tumorale. De ce s-ar aștepta ca o mutație într-o singură copie a unei gene supresoare tumorale să se comporte ca o genă recesivă ?
10. O variantă genetică a proteinei retinoblastomului, numită PSM-RB (RB mutată la situsul de fosforilare), nu poate fi fosforilată de complexul CDK4 /ciclină DI. Explicați de ce se spune că PSM-RB are un efect constitutiv de suprimare a creșterii asupra ciclului celular.

11. O parte din proteina Ras este asociată cu membrana plasmatică , iar o parte se extinde în citoplasmă. Cum transmite proteina Ras semnalul din afara celulei către citoplasmă? Ce se întâmplă dacă gena *Ras* este mutată?
12. Dacă o celulă suferă leziuni la ADN în faza S , cum poate fi reparată această leziune înainte ca celula să intre în mitoză?
13. Diferențiați între oncogene și proto-oncogene. În ce moduri poate o proto-oncogenă să devină o oncogenă?
14. Dintre cele două clase de gene asociate cu cancerul, genele supresoare tumorale și oncogenele, în ce grup pot fi considerate mutațiile mutații cu câștig de funcție? În ce grup sunt acestea mutații cu pierdere de funcție? Explicați răspunsul .
15. Cum contribuie o translocație, cum ar fi translocația cromozomului Philadelphia , la apariția cancerului?
16. Explicați de ce multe virusuri oncogene conțin gene ale căror produse interacționează cu proteinele supresoare tumorale .
17. Secvențierea ADN-ului a furnizat date care indică faptul că celulele canceroase pot conține zeci de mii de mutații somatice, deși doar unele dintre acestea conferă un avantaj de creștere unei celule canceroase. Cum descriu și clasifică oamenii de știință aceste populații nou descoperite de mutații în celulele canceroase?
18. Cum se protejează celulele de acumularea de mutații în genele lor care pot duce la cancer? Prin ce diferă celulele canceroase de celulele normale în ceea ce privește aceste procese ?
19. Descrieți diferența dintre un virus cu transformare acută și un virus care nu provoacă tumori.

20. Epigenetica este un domeniu relativ nou al geneticii , care se concentrează pe fenomenele care afectează expresia genelor, dar nu și secvența ADN-ului . Efectele epigenetice sunt cvasi- stabile și pot fi transmise celulelor somatice sau germinale ale urmașilor . Care sunt cauzele cunoscute ale evenimentelor epigenetice și cum sunt acestea legate de cancer?
21. Radioterapia (tratamentul cu radiații ionizante) este unul dintre cele mai eficiente tratamente actuale pentru cancer. Aceasta funcționează prin deteriorarea ADN-ului și a altor componente celulare. Cum poate radioterapia controla sau vindeca cancerul și de ce are adesea efecte secundare semnificative ?
22. În prezent, sunt disponibile teste genetice care detectează mutații în oncogenele *BRCA1* și BRCA2 . Aceste teste relevă diverse mutații ale acestor gene - *mutații care au fost* legate de cancerul de sân familial. Să presupunem că o tânără suspectată de cancer de sân familial este supusă unui test genetic BRCA1 . și *BRCA2, iar* rezultatele sunt negative . Adică , rezultatul testului pentru alelele mutante *BRCA1* și BRCA2 Rezultatul nu este pozitiv. Poate fi considerată această femeie fără riscul de cancer la sân ?
23. Explicați paradoxul aparent conform căruia în aceeași celulă canceroasă se găsesc adesea atât hipermetilarea, cât și hipometilarea ADN-ului .
24. Ca membră a unui proiect de cercetare în domeniul cancerului , ea a descoperit o genă care prezintă mutații în multe tumori metastatice . - După ce a determinat secvența de ADN a acestei gene, o compară cu secvențele altor gene disponibile în baza de date cu secvențe ale genomului uman. Gena ei codifică o secvență de aminoacizi care seamănă cu cele găsite în unele proteaze serice . Ea speculează asupra modului în care noua ei genă ar putea contribui la dezvoltarea cancerelor extrem de invazive .

Problemas extrapicantes

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor , consultați www.rnasteringgenetics.com

25 Un studiu realizat de Bose și colegii săi (1998. *Blood* 92:3362-67) și un studiu anterior realizat de Biernaux și colegii săi (1996. *Bone Marrow Transplant* 17: (Supl. 3) S54-S47) au arătat că 25 până la 30 % dintre adulții sănătoși care nu dezvoltă leucemie mieloidă cronică (LMC) au transcrieri ale genei de fuziune *BCR-ABL* . Am explicat cum acești oameni pot fi purtători ai unei gene de fuziune care este activă transcripțional și să nu dezvolte LMC.

26 Persoanele care moștenesc o alelă mutantă a genei *RB1* prezintă riscul de a dezvolta un cancer osos numit osteosarcom . Imaginați -vă că bănuim că în aceste cazuri osteosarcomul necesită o mutație a celei de-a doua alele *RR1.* și că am cultivat câteva celule de osteosarcom și am obținut o clonă ADNc a unei gene *RBL* umane Un coleg ne trimite un articol de cercetare care dezvăluie că o tulpină de șoareci predispuși la cancer dezvoltă tumori maligne atunci când sunt injectați cu celule de osteosarcom . Imaginați-vă, de asemenea, că obținem câțiva dintre acești șoareci. Folosind aceste trei resurse , ce experimente ați realiza pentru a determina

(a) Dacă celulele de osteosarcom poartă două mutații *RBl* ,

(b) dacă celulele de osteosarcom produc orice proteină pRB și (d) dacă adăugarea unei gene *RBl* Va schimba tratamentul normal potențialul celulelor de osteosarcom de a provoca cancer?

27. Tabelul din această problemă rezumă o parte din datele colectate despre mutațiile *BRCA1* în familiile cu o incidență ridicată atât a cancerului de sân cu debut precoce , cât și a cancerului ovarian .

(a) Observați efectul asupra codului găsit în grupul relativ 2082 , care rezultă dintr-o substituție cu o singură bază. Desenați secvența normală de ADN dublu catenar a acestui codon (cu capetele 5 ' și 3' etichetate) și arătați secvența evenimentelor care au condus la această mutație, presupunând că a rezultat dintr- o nepotrivire necorectată în timpul replicării ADN-ului .

(b) Examinați tipurile de mutații enumerate în tabel și stabiliți dacă gena BRCA1 este mai probabil să fie o genă supresoare tumorală sau o oncogenă.

(c) Deși mutațiile enumerate în tabel sunt în mod clar dăunătoare și cauzează cancer la sân la femeile foarte tinere, fiecare grup are cel puțin o femeie care a purtat mutația, dar a trăit până la vârsta de cel puțin 80 de ani fără a dezvolta cancer. Enumerați cel puțin două mecanisme (sau variabile) diferite care ar putea sta la baza variației expresiei unui fenotip mutant și propuneți o explicație pentru penetranța incompletă a acestei mutații. Cum se corelează aceste mecanisme sau variabile cu această explicație?

Mutațiile ***BRCA1*** care cauzează predispoziție

Rudă	Codon	Efectul schimbării nudeotidice asupra codului		Frecvența în cromozomii de control
1		24 -11 puncte de bază	Schimbare în faza de citire sau tăiere și îmbinare	0/180
2	1313	C-*T	Gin — *Stop	0/170
3	1756	C suplimenta r	Citirea schimbării de fază	0/162
4	1775	T—>G	Met —* Arg	0/120
5	N / A*	Ei?	Pierderea transcrierii	N / A*

Sursă: **1994. *Science* 266:66-71. AAAS**

***NA înseamnă nu se aplică, deoarece mutația reglatoare este doar dedusă, iar poziția sa nu a fost identificată .**

28. Următorul tabel prezintă polimorfisme neutre găsite în familiile de control (cele care nu prezintă o frecvență crescută a cancerului de sân și ovarian) . Examinați datele din tabel și răspundeți la următoarele întrebări :

(a) Ce se înțelege prin polimorfism neutru?

(b) Care este semnificația acestui tabel, în contextul examinării unei familii sau populații pentru mutații *BRCA1* care predispun indivizii la cancer?

(c) Este polimorfismul PM2 mai probabil să fie cauzat de o mutație neutră fără sens sau de o mutație silențioasă ?

(d) Răspundeți la întrebarea (c) pentru polimorfismul PM3.

Polimorfisme neutre în *BRCA1*

Nume	Locația codonului	Baza codonului	Frecvența în cromozomi control * LA	C.	G.	T.
PM1	317	2	152	0	10	0
PM6	878	2	0	55 de ani	0	100
PM7	1190	2	109	0	53	0
PM2	1443	3	0	115	0	58
PM3	1619	1	116	0	52	0

numărul *de cromozomi care au o bază specifică (A, C, C sau T) la situsul polimorfic indicat.*

** Codonul în poziția 1, 2 sau 3.*

29. Cancerul de prostată este una dintre principalele cauze ale deceselor asociate cancerului în rândul bărbaților . Modificările epigenetice care reglează expresia genelor sunt implicate atât în inițierea, cât și în progresia acestor tipuri de cancer. Tabelul de mai jos prezintă numărul de gene despre care se știe că sunt hipermetilate în celulele cancerului de prostată (modificat după Long -Cheng, L. et al., 2005, *Nati. Cancer Inst.* 97: 103-115). Pentru fiecare categorie de gene, speculați asupra mecanismului sau mecanismelor prin care inițierea sau progresia cancerului ar putea fi influențată de hipermetilare.

Hipermetilarea ADN-ului	Numărul de gene cunoscute
Genele răspunsului hormonal	5
Genele de control al ciclului celular	2
Genele de invazie a celulelor tumorale	8
Genele pentru repararea ADN-ului deteriorat	2
Genele de transducție a semnalului	4

CAPITOLELE SPECIALE DESPRE GENETICA MODERNĂ

CAPITOLUL SPECIAL 1

Genética forense

. Genetica este, fără îndoială, cea mai influentă știință din prezent , având un impact major asupra tehnologiilor în domenii diverse precum agricultura, arheologia, diagnosticul medical și tratamentul.

* „tratamentul bolilor”.

Unul dintre domeniile cele mai profund modificate de genetica modernă este știința criminalistică. Știința criminalistică folosește instrumente tehnologice și științifice pentru a răspunde la întrebări despre fapte în cazurile penale și civile. Înainte de 1986, specialiștii în științe criminalistice aveau un set limitat de instrumente pentru a lega probele de anumite persoane sau suspecți. Aceste instrumente includeau unele metode fiabile, cum ar fi determinarea tipului de sânge și amprentarea digitală, dar și multe altele nefiabile, cum ar fi microscopia capilară și compararea urmelor de mușcături.

amprentarea genetică a fost utilizată pentru prima dată în domeniul criminalistic în 1986 (Caseta 1), genetica criminalistică a devenit o metodă importantă pentru organele de aplicare a legii de a identifica originea materialelor biologice. Amprentarea genetică poate fi obținută acum din saliva lăsată pe mucuri de țigară sau timbre poștale , din firele de păr de animale găsite la locul unei crime sau din pete de sânge mici cât un cap de ac. Chiar și probele biologice degradate de foc sau de trecerea timpului produc amprente genetice care ajută sistemul judiciar să determine identitatea, nevinovăția sau vinovăția unei persoane . Anchetatorii analizează acum baze de date mari de profiluri ADN stocate pentru a găsi potriviri cu profilurile obținute din probele găsite la locul unei crime. Amprentarea genetică a permis exonerarea a sute de persoane care fuseseră condamnate pentru infracțiuni extrem de grave și chiar condamnate la moarte. Criminaliștii au folosit profiluri genetice pentru a identifica victimele unor dezastre precum tsunami-ul din 2004 care a lovit Asia și atacurile teroriste din 11 septembrie 2001 din New York. De asemenea , au folosit analiza ...

Chiar și probele biologice degradate de incendiu sau de trecerea timpului oferă urme genetice care ajută sistemul judiciar să determine identitatea, nevinovăția sau vinovăția unei persoane

RECUADRO 1
El caso Pitchfork: la primera condena criminal utilizando perfiles de ADN

mediados de la década de 1980, se encontraron en ¡ W Leicestershire, Inglaterra, los cuerpos de dos colegialas, Lynda Mann y Dawn Ashworth. Ambas niñas habían sido violadas y estranguladas, y sus cuerpos habían sido abandonados entre unos matorrales. En ausencia de cualquier pista útil, la policía interrogó a un portero local deficiente mental, llamado Richard Buckland, que tenía un historial previo de agresiones sexuales. Durante el interrogatorio, Buckland confesó el asesinato de Dawn Ashworth; sin embargo, la policía no sabía si era también responsable de la muerte de Lynda Mann. En 1986, para identificar al segundo asesino, la policía pidió al Dr. Alec Jeffreys de la universidad de Leicester que probara un nuevo método de análisis de ADN denominado huella genética. El Dr. Jeffreys había desarrollado un método de análisis de regiones de ADN denominadas *repeticiones en tándem en número variable* **(VNTR), que varían en longitud entre los miembros de una población. El análisis de VNTR del Dr. Jeffreys reveló una correspondencia entre los perfiles de ADN de las muestras de semen obtenidas en las dos escenas del crimen, lo que sugería que una misma persona era responsable de ambas violaciones. Sin embargo, ninguno de los perfiles de ADN se correspondía con los obtenidos de una muestra de sangre de Richard Buckland. Habiendo descartado a su único sospechoso, la policía se embarcó en la primera operación masiva de obtención de ADN de la historia, solicitando muestras de sangre de todos los hombres adultos de la región. Aunque 4000 hombres ofrecieron una muestra de su sangre, uno no lo hizo. Colin Pitchfork, trabajador de una panadería, pago a un amigo para que proporcionara una muestra de sangre en su lugar, utilizando documentos de identidad falsificados. Su plan fue detectado cuando la conversación entre los dos fue oída por casualidad en un pub local. La policía fue informada de esa conversación y procedió a arrestar a Pitchfork, obtener una muestra de su sangre, y enviarla a analizar. Su perfil de ADN se correspondía con los perfiles obtenidos de las muestras de semen dejadas en las dos escenas del crimen. Pitchfork confesó los asesinatos, se declaró culpable y fue sentenciado a cadena perpetua. El caso Pitchfork no fue solo el primer caso criminal resuelto mediante la obtención de perfiles de ADN, sino que también fue el primer caso en el que los perfiles de ADN condujeron a la exculpación de una persona inocente.**

Criminalistica ADN este utilizată pentru identificarea animalelor, inclusiv a speciilor pe cale de dispariție traficate în comerțul ilegal cu animale sălbatice. Puterea imensă a criminalisticii ADN a captivat publicul , iar genetica criminalistică apare în mod proeminent în mai multe seriale de televiziune populare .

Aplicațiile amprentării genetice se extind mult dincolo de investigațiile criminalistice . Acestea includ testarea paternității și a relațiilor familiale , identificarea materialului vegetal, verificarea soldaților uciși în luptă și studii asupra evoluției.

Este important să înțelegem cu toții elementele de bază ale - analizei criminalistice a ADN-ului. Ca cetățeni informați, trebuie să monitorizăm aplicațiile și potențialele abuzuri ale acesteia. Deși amprentarea ADN este bine validată din punct de vedere tehnic și considerată standardul incontestabil al investigației criminalistice , ea încă ridică controverse și nu trebuie să renunțăm la dreptul ca această tehnică să fie monitorizată de autoritățile legislative .

special , vom vedea cum funcționează profilarea ADN și cum sunt interpretate rezultatele . Vom afla despre bazele de date ADN , potențialele probleme asociate cu profilarea ADN și viitorul acestei tehnologii puternice .

Metode de obținere a profilurilor ADN

Amprentă genetică bazată pe VNTR

identificării bazate pe ADN a început în 1984, când Dr. Alec Jeffreys și-a publicat lucrarea despre loci ADN cunoscuți sub numele de repetiții în tandem cu număr variabil (VNTR), cunoscuți și sub denumirea de minisateliți. Așa cum este descris în Capitolul 12, VNTR-urile sunt situate în regiuni necodificatoare ale genomului și constau din secvențe de ADN cu lungimea cuprinsă între 15 și 100 de perechi de baze , fiecare unitate repetată de mai multe ori. Numărul de repetiții la fiecare locus VNTR variază de la o persoană la alta și, prin urmare, VNTR-urile pot varia în lungime de la 1 la 20 de kilobaze (kb), în funcție de individ. De exemplu, VNTR ...

5'-GACTGCCTGCTAAGATGACTGCCTGCTAA-
GATGACTGCCTGCTAAGAT-3'

Este compusă din trei repetiții în tandem ale unei secvențe de 16 nucleotide (evidențiate cu caractere aldine).

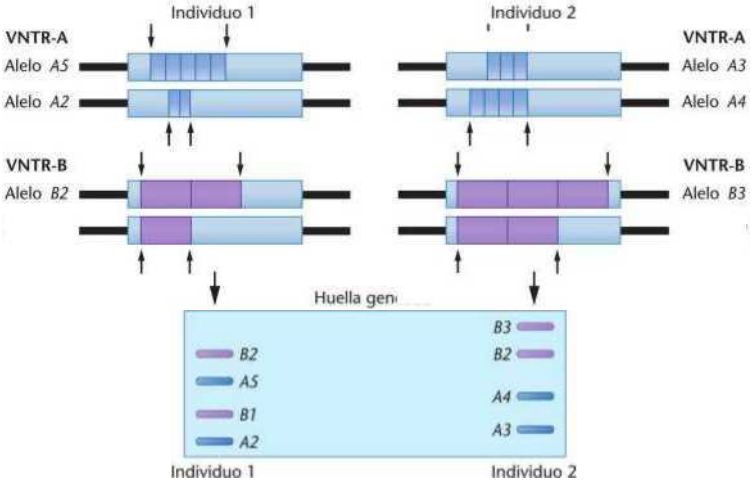


FIGURA CEI J Amprentă genetică corespunzătoare a două loci VNTR de la două persoane diferite. Sunt prezentate aripioarele VNTR corespunzătoare a două loci (A și O) pentru doi indivizi diferiți. Săgețile marchează situsurile de clivaj ale enzimei de restricție, care flanchează regiunile VNTR. Digestia cu enzima de restricție produce o serie de fragmente care pot fi separate prin electroforeză în gel *și* detectate ca benzi într-un test de hibridizare Southern (jos). Numărul de repetiții la fiecare locus este variabil, astfel încât modelul general de benzi este distinct pentru fiecare individ. Profilul amprentei genetice arată că acești indivizi au în comun o alelă (62).

Repertorii VNTR sunt utili pentru profilarea ADN-ului deoarece există până la 30 de alele posibile (lungimi repetitive) la orice VNTR dat într -o populație . Acest lucru creează un număr mare de genotipuri posibile. De exemplu, dacă examinăm patru loci VNTR distincti într-o populație și fiecare locus are 20 de alele posibile, ar exista peste 2 miliarde (4^{-1}) de genotipuri posibile în acest profil obținut din patru loci .

Pentru a crea un profil VNTR (numit și amprentă genetică), oamenii de știință extrag ADN dintr-o probă de țesut și îl digeră cu o enzimă de restricție care taie pe ambele părți ale regiunii repetitive VNTR (Figura CELI). ADN-ul digerat este separat prin electroforeză pe gel și analizat folosind hibridizarea Southern blot (descrisă în detaliu în Capitolul 20). Pe scurt , ADN-ul separat este transferat din gel pe o membrană și hibridizat cu o sondă radioactivă care recunoaște secvențele de ADN din regiunea VNTR. După expunerea membranei la un film cu raze X , se măsoară modelul de benzi. Alelele repetitive VNTR mai mari rămân în apropierea părții superioare a gelului, în timp ce VNTR-urile mai mici, care migrează mai rapid prin gel, apar mai aproape de partea inferioară. Modelul de benzi este același pentru orice individ dat , indiferent de țesutul utilizat ca sursă de ADN. Dacă se analizează un număr suficient de regiuni VNTR , profilul ADN al fiecărei persoane va fi unic (cu excepția, desigur, a gemenilor identici), datorită numărului enorm de regiuni VNTR și posibile alele. În practică, oamenii de știință analizează cinci sau șase loci pentru a obține un profil ADN.

O limitare majoră a profilării VNTR este aceea că necesită o probă de ADN relativ mare (10.000 de celule sau aproximativ 50 µg de ADN) - mai mult decât se găsește de obicei la o scenă a crimei tipică. În plus, ADN-ul trebuie să fie relativ intact (nu degradat). Prin urmare, profilarea VNTR a fost utilizată în principal atunci când sunt disponibile probe mari de țesut - cum ar fi în testarea paternității. Deși profilarea VNTR este încă utilizată în unele cazuri astăzi , aceasta a fost în mare parte înlocuită de alte metode, mai sensibile, așa cum este descris mai jos.

Profilarea ADN-ului folosind regiuni STR

autozomale

Dezvoltarea tehnicii reacției în lanț a polimerazei (PCR) a - revoluționat domeniul profilării ADN-ului . Metodele PCR sunt descrise în detaliu în Capitolul 20. Folosind probe de ADN amplificate prin PCR ,

oamenii de știință pot genera profiluri ADN din urme (de exemplu, bulbul unui fir de păr rătăcit sau câteva celule dintr-o pată de sânge) și din probe vechi sau degradate (cum ar fi un os găsit pe un câmp sau o mumie egipteană antică).

Majoritatea profilărilor ADN-ului criminalistic la oameni se efectuează în prezent folosind kituri comerciale care amplifică și analizează regiuni ale genomului cunoscute sub numele de microsateliți sau repetiții scurte în tandem (STR). STR-urile sunt similare cu VNTR-urile, dar motivul repetitiv este mai scurt - între două și nouă perechi de baze, repetate de 7 până la 40 de ori. De exemplu, un locus cunoscut sub numele de D8S1179 constă din secvența TCTA de patru perechi de baze, repetată de 7 până la 20 de ori, în funcție de alelă. Există 19 alele posibile ale acestui locus într-o populație. Deși există sute de loci STR în genomul uman, doar un subset al acestora sunt utilizate pentru profilarea ADN-ului. FBI-ul și alte agenții de securitate ale guvernului SUA au selectat 13 loci STR pentru a le utiliza ca grup central pentru analiza criminalistică (Figura CE 1.2).

Astăzi, pentru analiza criminalistică a ADN-ului pe baza loci STR se utilizează mai multe kituri disponibile comercial . Metodele variază ușor, dar, în general, necesită următorii pași. După cum se arată în Figura CEI.3, fiecare set de primeri este marcat cu unul dintre cei patru coloranți fluorescenți - albastru, verde, galben sau roșu. Fiecare set de primeri este conceput pentru a amplifica - fragmente de ADN, ale căror dimensiuni variază în funcție de numărul de repetiții din regiunea amplificată.

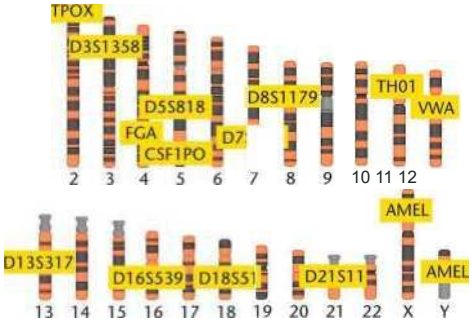


FIGURA CE1.2 Pozițiile cromozomiale ale celor 13 loci STR fundamentali utilizați pentru obținerea profilelor ADN criminalistice. Locusul *AMEL (Amelogenină)* este adăugat la setul celor 13 loci fundamentali și este utilizat pentru a determina sexul persoanei care a furnizat proba de ADN. Locusul AMEL de pe *cromozomul* X conține o deleție de 6 nucleotide față de cea de pe cromozomul Y.

FIGURA CEI.3 Intervale de dimensiuni relative și culori de marcare cu coloranți fluorescenți pentru 16 produse STR generate folosind un kit de profilare ADN disponibil comercial. Fragmentele de ADN prezentate cu portocaliu în partea de jos a diagramei sunt markeri de dimensiune a ADN-ului . Locusul *AMEL* este indicat de litera *A. (Din kitul Applied Biosystems AmpFLSTR Identifiler, http://www.appliedbiosystems.com).*

De exemplu, seturile de primeri care amplifică locusurile STR D19S433, vWA, TPOX și D18S51 sunt toate marcate cu un marker galben fluorescent. Dimensiunile fragmentelor de ADN amplificate generate permit oamenilor de știință să diferențieze între produsele marcate cu galben . De exemplu, produsele amplificate din locusul D19S433 au o lungime cuprinsă între 100 și 150 de perechi de baze , în timp ce cele din locusul vWA au o lungime cuprinsă între 150 și 200 de perechi de baze și așa mai departe .

După amplificare , proba de ADN va conține o cantitate mică din proba originală de ADN utilizată ca șablon și o cantitate mare de produse de amplificare marcate fluorescent (Figura CEI.4). Dimensiunile fragmentelor amplificate sunt măsurate prin electroforeză capilară . Această metodă utilizează tuburi subțiri de sticlă umplute cu un gel de poliacrilamidă similar cu cel utilizat în electroforeza pe gel . Proba de ADN amplificată este încărcată în partea superioară a tubului capilar , iar prin acesta trece un curent electric . Fragmentele de ADN încărcate negativ migrează prin gel spre electrodul pozitiv , în funcție de dimensiunile lor respective. Fragmentele mai scurte se mișcă mai rapid prin gel , în timp ce fragmentele mai mari se mișcă mai lent. În partea de jos a tubului , un laser detectează fiecare fragment fluorescent pe măsură ce migrează . Datele sunt analizate folosind un software care calculează atât dimensiunile fragmentelor , cât și cantitățile acestora , iar aceste date sunt reprezentate ca vârfuri pe un grafic (Figura CE1.5). De obicei, sistemele automate de electroforeză capilară permit analiza simultană a până la 16 probe , iar analiza durează aproximativ 30 de minute.

După obținerea profilului ADN , acesta poate fi comparat direct cu cel al unei alte persoane, cu probe obținute la locul faptei sau cu alte profiluri stocate în bazele de date cu profiluri ADN (Figura CEI.6).

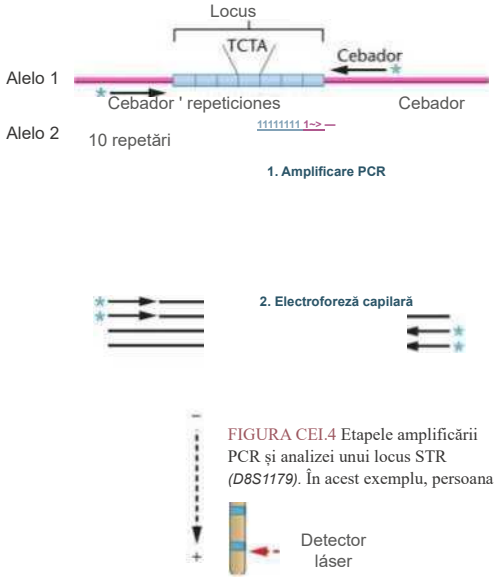


FIGURA CEI.4 Etapele amplificării PCR și analizei unui locus STR *(D8S1179)*. În acest exemplu, persoana este heterozigotă pentru *locusul D8S1179:* O alelă are 7 repetiții, iar cealaltă are 10. Primerii sunt specifici pentru secvențele care flanchează locusul STR și sunt marcați cu un colorant albastru fluorescent. ADN-ul dublu catenar este denaturat, primerii sunt renaturați , iar fiecare alelă este amplificată prin PCR în prezența celor patru dNTP-uri și a ADN polimerazei Taq. După amplificare, produsele marcate sunt separate în funcție de dimensiune prin electroforeză capilară, urmată de detecție fluorescentă.

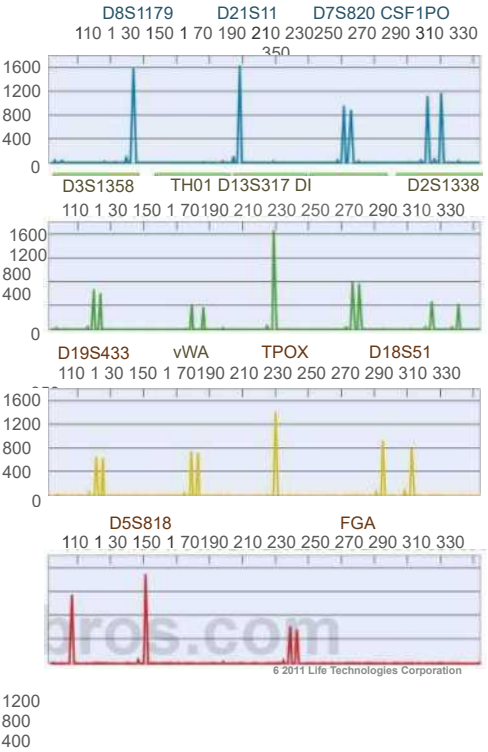


FIGURA CE1.5 O electroferogramă care prezintă rezultatele analizei de profilare ADN utilizând kitul de profilare STR cu 16 loci din Figura CE1.3 . Loci-urile heterozigote sunt reprezentate ca vârfuri duble , iar loci-urile homozigote ca vârfuri simple mai înalte . Dimensiunile fiecărei alele pot fi calculate din pozițiile vârfurilor în raport cu axa dimensiunilor reprezentată în partea de sus a fiecărui grafic. Vârful singular al *locusului* AMEL (*A)* Indică faptul că acest profil ADN corespunde unei femei, așa cum este descris în text.

Genotipul profilului STR al unui individ este exprimat ca numărul de repetări ale secvenței STR. De exemplu, în profilul prezentat în Figura CE 1.6, profilul persoanei ar fi exprimat așa cum se arată în Tabelul CEI. 1.

Oamenii de știință interpretează profilurile STR folosind statistică, probabilități și genetică populațională, metode pe care le vom discuta în secțiunea „Interpretarea profilurilor ADN".

Genotipul profilelor STR pentru cele patru profiluri prezentate în Figura CE1.6

locusului STR **din**

TABLA CE 1.1

	Suspect	Victimă	Celule epiteliale	Fracția de spermă
DS1358	15,18	16,17	16,17	15,18
vWA	15,18	16,16	16,16	15,18
FGA	22,25	21,26	21,26	22,25

1600

Profilul STR al cromozomului Y

În multe aplicații criminalistice , este important să se diferențieze profilurile ADN a două sau mai multe persoane dintr -o probă mixtă. De exemplu, frotiurile vaginale în cazurile de viol conțin adesea un amestec de spermatozoizi feminini și masculini . În plus, unele probe de la locul crimei conțin dovezi de la mai mulți suspecți de sex masculin . În aceste tipuri de cazuri, profilarea ADN-ului STR pe cromozomul Y este utilă . Există peste 200 de loci STR pe cromozomul Y care sunt utili pentru profilarea ADN-ului ; cu toate acestea , mai puțin de 20 dintre acești loci sunt utilizați în mod curent

pentru analiza criminalistică. Amplificarea PCR a STR-urilor cromozomului Y utilizează primeri specifici care nu amplifică ADN - ul cromozomului X.

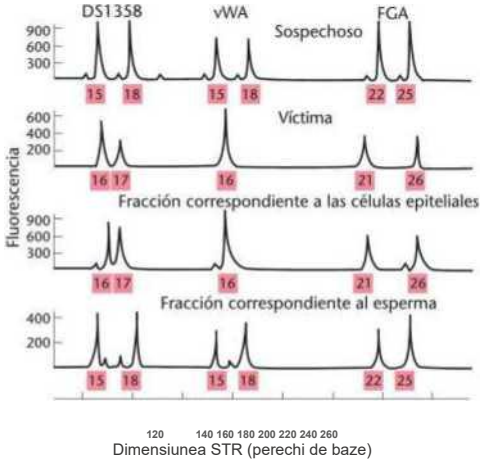


FIGURA CE1.6 Electroforegramă care prezintă profilurile STR a patru probe dintr-un caz de viol. Trei loci STR au fost examinați din probe prelevate de la un suspect, o victimă și două fracțiuni ale unui frotiu vaginal prelevate de la victimă. Axa x prezintă scala dimensiunilor ADN-ului, în timp ce axa y *indică* intensitatea relativă a fluorescenței. Numărul de sub fiecare alelă indică numărul de repetiții din fiecare alelă, măsurat conform scalei dimensiunilor ADN-ului. Rețineți că profilul STR al probei de spermă prelevate de la victimă corespunde cu cel al suspectului.

O limitare a profilării ADN-ului cromozomului Y este că nu poate diferenția între ADN-ul taților și al fiilor sau între frați . Acest lucru se datorează faptului că cromozomul Y este moștenit direct de la tată la fiu ca o singură unitate. Cromozomul Y nu suferă - recombinare, ceea ce înseamnă că există o variabilitate genetică mai mică în acest cromozom decât în autozomi . Prin urmare, toate rudele patriliniar înrudite au același profil al cromozomului Y. Chiar și doi bărbați aparent fără legătură de rudenie pot avea același profil al cromozomului Y dacă au în comun și un strămoș masculin îndepărtat.

Deși aceste caracteristici ale profilurilor bazate pe cromozomul Y au limitări pentru unele aplicații criminalistice, ele sunt utile pentru identificarea persoanelor dispărute atunci când ADN -ul unei rude de sex masculin este disponibil pentru comparație . De asemenea, ele permit cercetătorilor să urmărească liniile paterne în studiile de genetică genealogică (Caseta 2) .

Profilul ADN-ului mitocondrial

metodele de profilare ADN este analiza ADN-ului mitocondrial (ADNmt) . Fiecare celulă somatică umană conține între 200 și 1.700 de mitocondrii. Fiecare mitocondrie conține unul sau mai mulți - cromozomi circulari de 16 kb. Mitocondriile se divid în interiorul celulelor și sunt distribuite celulelor fiice după diviziunea celulară. Mitocondriile sunt transmise de la ovul la zigot în timpul fertilizării; cu toate acestea, deoarece spermatozoizii contribuie cu puține, dacă nu cu deloc, cu mitocondrii la zigot, ei nu contribuie cu aceste organite la următoarea generație. Prin urmare, toate celulele unui - individ conțin copii multiple de mitocondrii identice derivate de la mamă. La fel ca ADN-ul cromozomului Y, ADNmt suferă foarte puțină recombinare, dacă nu cu deloc, și este moștenit ca o singură unitate.

Oamenii de știință creează profiluri de ADNmt prin amplificarea regiunilor de ADNmt care prezintă variabilitate între populații și indivizi neînrudiți. Două regiuni utilizate în mod obișnuit sunt cunoscute sub numele de segmentul hipervariabil I și II (HVSI și HVSII), Figura CEI.7. După amplificarea PCR, secvența de ADN conținută în această regiune este determinată folosind mecanisme automate de secvențiere a ADN-ului. Oamenii de știință compară apoi secvența cu cea a altor indivizi sau cu probe de la locul crimei pentru a determina dacă există o potrivire.

Faptul că celulele conțin cantități enorme de copii de ADNmt face ca analiza sa să fie utilă în cazurile în care probele de la locul crimei sunt rare, vechi sau degradate. Profiluri ADN

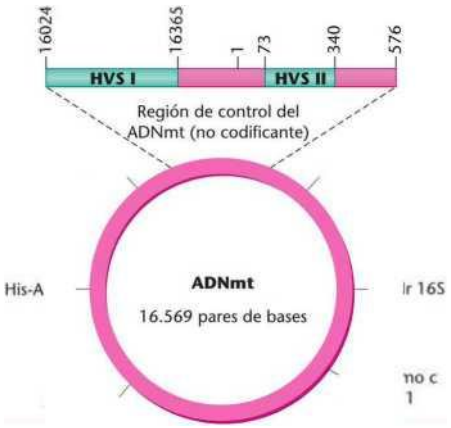


FIGURA CE1.7 Moleculă de ADNmt uman care prezintă locațiile regiunilor HVS I și II în raport cu alte gene ADNmt. Regiunea de control a ADNmt este compusă din 1.122 de perechi de baze . Analiza criminalistică a ADN-ului implică secvențierea celor două regiuni HVS (610 perechi de baze în total) și compararea secvențelor între indivizi sau între probe. Diferențele de secvență includ duplicații scurte de dinucleotide , precum și modificări ale unei singure perechi de baze .

Profilurile ADNmt sunt deosebit de utile pentru identificarea

victimelor crimelor în masă sau ale dezastrelor, cum ar fi masacrul de la Srebrenica din 1995 și atacurile de la World Trade Center din 2001 , unde probele de referință au fost furnizate de rude (Caseta 3). Principalul dezavantaj al profilurilor ADNmt este că nu este posibil să se facă diferența între ADNmt-ul unui individ și cel al rudelor sau fraților săi materni . La fel ca în cazul profilurilor cromozomului Y , profilurile ADNmt pot fi comune între doi indivizi aparent fără legătură de rudenie , care au în comun și un strămoș îndepărtat - în acest caz, un strămoș matern. Cercetătorii folosesc profilurile ADNmt în studii științifice de genealogie, evoluție și migrații ale populațiilor umane.

fost utilă și în cazurile criminalistice care implică fauna sălbatică. Miliarde de dolari sunt implicate în comerțul ilegal cu animale sălbatice la nivel mondial . Identificarea speciilor de origine a materialului vegetal și animal este adesea esențială pentru urmărirea penală cu succes a traficanților de animale sălbatice. Caseta 4 prezintă un caz de contrabandă ilegală cu ouă de păsări în Australia, care a fost rezolvat folosind secvențierea ADN-ului mitocondrial .

Profiluri de polimorfism cu un singur nucleotid

Polimorfismele cu un singur nucleotid (SNP) sunt diferențe între un singur nucleotid și două molecule de ADN. Acestea pot fi modificări ale perechilor de baze sau mici inserții sau deleții (Figura CEI.8). SNP-urile apar aleatoriu în tot genomul și în ADN-ul mitocondrial (ADNmt), la fiecare 500 până la 1.000 de nucleotide. Aceasta înseamnă că există potențial milioane de loci în genomul uman care pot fi utilizați pentru profilare . Cu toate acestea, deoarece SNP-urile au de obicei doar două alele, sunt necesare multe SNP-uri (50 sau mai multe) pentru a crea un profil ADN care să poată distinge între doi indivizi la fel de eficient ca STR-urile .

Oamenii de știință analizează SNP-urile folosind primeri specifici pentru a amplifica regiunile de interes. Regiunile ADN amplificate sunt apoi analizate folosind diverse metode, cum ar fi secvențierea automată a ADN-ului sau hibridizarea cu sonde imobilizate pe un cip ADN , ceea ce le permite să distingă între moleculele de ADN care diferă printr-un singur nucleotid.

Profilurile criminalistice SNP au un avantaj semnificativ față de profilurile STR. Deoarece un SNP implică doar un singur

RECUADRO 2

El ADN de Thomas Jefferson: paternidad y más allá

Durante más de dos siglos, los historiadores han estado debatiendo acerca de si el presidente de los Estados Unidos Thomas Jefferson había tenido uno o más hijos con Sally Hemings, una de sus esclavas. En 1997, en un intento de resolver la controversia, los científicos analizaron los perfiles de ADN del cromosoma Y de las líneas masculinas Jefferson y Hemings. Puesto que Jefferson no tenía ningún descendiente vivo por línea masculina, los investigadores utilizaron la prueba del cromosoma Y de cinco descendientes por línea paterna del tío paterno de Jefferson. También analizaron el ADN de un descendiente por línea paterna de Eston Hemings Jefferson, el hijo más joven de Sally Hemings, así como el ADN de tres descendientes por línea paterna de los hijos de la hermana de Jefferson y cinco descendientes por línea paterna de Woodson, que afirmaba ser el primer hijo de Sally Hemings. Los perfiles de ADN fueron generados a partir de 11 loci STR del cromosoma Y, un minisatélite de mayor tamaño (MSY1) y siete loci de tipo SNP que difieren en un nucleótido. Los cinco varones de la línea Jefferson compartían idénticos perfiles del cromosoma Y, excepto por uno de los individuos que tenía una mutación en un locus STR. Los perfiles de la línea familiar Woodson no se correspondían con los de la línea Jefferson, lo que excluye a Thomas Woodson como hijo de Thomas Jefferson. De forma similar, y no inesperada, los sobrinos de Jefferson no compartían su perfil del cromosoma Y. Sin embargo, el perfil del cromosoma Y de los descendientes masculinos de Eston Hemings era idéntico a los perfiles de la línea Jefferson. Aunque estos datos apoyan la idea de que Jefferson tuvo al menos un hijo con Sally Hemings, no excluye la posibilidad de que otro Jefferson varón (por ejemplo el hermano de Thomas Jefferson, los hijos de ese hermano o algún otro varón que compartiera el cromosoma Y de Jefferson) pudiera haber sido el padre de Eston Hemings.

Otro hallazgo interesante que surgió del estudio del ADN de Jefferson fue que el patrón del perfil del cromosoma Y de Jefferson (haplotipo K2) es extremadamente raro en los europeos. Se presenta predominantemente en hombres de África y de la parte occidental de Eurasia. También se encuentra en personas de origen judío del norte de África, Egipto y Oriente Medio. En 2007, los genetistas descubrieron que el haplotipo K2 (y correspondencias con el perfil cromosoma Y de Jefferson) en 2 de cada 85 hombres que llevan el apellido Jefferson en Gran Bretaña; por tanto, es probable que la familia de Jefferson viniera originalmente de Gran Bretaña, como el afirmaba. Sin embargo, también sugiere que en algún momento del pasado un cromosoma Y con origen en África o en Oriente Medio entró en la línea Jefferson. Para aumentar las especulaciones sobrejefferson, algunos comentaristas han sugerido que Jefferson fue el «primer presidente judío» de los Estados Unidos.

CASETA 3
Atacurile de la World Trade Center: identificarea victimelor prin profiluri ADN

Profilarea criminalistică a ADN-ului a jucat un rol crucial în identificarea victimelor atacurilor din 11 septembrie - 2001 din New York. Numărul oficial al morților a fost de 2.749. Doar 293 de cadavre complete au fost recuperate; victimele rămase au fost reprezentate de peste 20.000 de fragmente de os și țesut moale. Cea mai mare parte a materialului biologic a fost redusă la praf de prăbușirea clădirilor , incendii și - descompunerea bacteriană .

Foarte puține dintre victime au putut fi identificate folosind tehnici precum analiza amprentelor digitale sau examinarea dentară medico-legală . Principala sarcină de identificare a fost efectuată folosind profilarea ADN , utilizând serviciile Biroului Medical Legistului și ale unor companii private de biotehnologie. Pentru a identifica victimele , laboratoarele au colectat efecte personale (cum ar fi perii de păr, periuțe de dinți și aparate de ras), precum și tampoane bucale furnizate de rude. Oamenii de știință au analizat apoi aceste efecte personale și rămășițele din dezastru, aplicând tehnici de profilare STR în încercarea de a găsi potriviri între profiluri. Din cauza stării rămășițelor, doar jumătate dintre acestea au produs profiluri ADN utilizabile. În încercarea de a identifica mai multe victime, oamenii de știință au început să utilizeze profilarea ADNmt, analiza SNP și o nouă tehnică care utilizează mini-STR. Mini-STR-urile sunt create prin mutarea primerilor PCR mai aproape de regiunile repetitive ale lociurilor STR. În acest fel, bucăți mai scurte de ADN pot fi amplificate corect folosind metode PCR. Datorită acestor metode, oamenii de știință au identificat încă câteva sute de victime. În ciuda acestor îmbunătățiri, peste 1.000 de victime rămân neidentificate.

CASETA 4 Cazul lui Pascal Della Zuana: coduri de bare genetice *și* analiză criminalistică aplicate faunei și florei

Pe 2 august 2006, un fotograf independent pe nume Pascal Della Zuana a fost reținut de agenții vamali pe Aeroportul Internațional Sydney din Australia. În timp ce îl interogau despre zborul său din Thailanda în Australia, agenții au observat că purta o vestă albă neobișnuită pe sub celelalte haine. În interiorul vestei, au descoperit 23 de ouă de pasăre ascunse.

Din cauza reglementărilor stricte de carantină din Australia, ouăle au trebuit tratate cu radiații pentru a fi sterilizate. Neputând incuba ouăle, autoritățile au recurs la obținerea de profiluri ADN în încercarea de a identifica originea și specia ouălor .

Ouăle au fost trimise Dr. Rebecca Johnson la laboratorul de identificare criminalistică a ADN-ului al Muzeului Australian . Dr. Johnson a prelevat o mică probă din fiecare ou și a extras ADN -ul. Ea a folosit metode PCR pentru a amplifica o regiune de aproximativ 650 de perechi de baze ale genomului mitocondrial din cadrul genei citocrom c oxidazei 1. Apoi a organizat aceste secvențe într-un format cunoscut sub numele de cod de bare genetic. Pentru a identifica specia, Dr. Johnson a comparat fiecare cod de bare genetic cu codurile de bare conținute într -o bază de date extinsă cu astfel de coduri, compilată la Universitatea din Guelph , Canada . Baza de date conține secvențe de coduri de bare ADN mitocondrial de la sute de muzee și universități din întreaga lume , catalogând peste 70.000 de specii diferite .

Rezultatele comparării secvențelor de coduri de bare efectuate de Dr. Johnson au fost de mare importanță . Vesta lui Della Zuana a ascuns ouă ale unor specii de păsări exotice , cum ar fi macaul, papagalul cenușiu cu coadă roșie și papagalul eclectic, precum și o specie rară pe cale de dispariție , cacaduul din Moluca .

Pe 20 ianuarie 2007, Pascal Della Zuana a fost găsit vinovat de încălcarea Convenției privind *comerțul* internațional *cu* specii pe cale de dispariție (CITES) . precum și trei legi australiene privind vama și carantina. A fost amendat cu 10.000 de dolari și condamnat la doi ani de închisoare .

În timpul procesului , s-a dezvăluit că, dacă ar fi fost incubate, acele păsări s-ar fi vândut cu aproximativ 250.000 de dolari pe piața neagră . Se crede că contrabanda - globală cu faună și floră sălbatică, precum și cu părți de animale și plante , generează până la 150 de miliarde de dolari anual - a doua ca profit ilicit după droguri și arme .

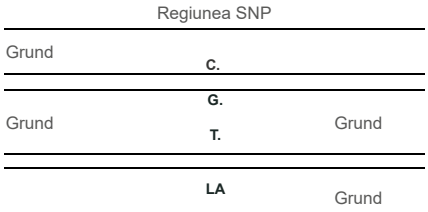


FIGURA CE1.8 Exemplu de polimorfism cu un singur nucleotid (SNP) la o persoană heterozigotă la locusul SNP.
Alela 1
Săgețile indică pozițiile primerilor PCR utilizați pentru amplificarea regiunii SNP înainte de analiza secvenței ADN. Dacă acest locus din
Alela 2
exemplu ar avea doar două alele cunoscute - alelele C și T - ar exista trei genotipuri posibile în populație: CC, TT și CT. Individul din acest
SNP
exemplu are genotipul CT.

Dimensiunea teoretică a ADN-ului necesară pentru o reacție PCR este egală cu dimensiunea a doi primeri plus un nucleotid suplimentar (adică aproximativ 50 de nucleotide). Această caracteristică face ca analiza SNP să fie potrivită pentru analiza probelor de ADN sever degradate. În ciuda acestui avantaj, profilarea SNP nu a fost încă utilizată în mod curent în aplicațiile criminalistice . Cercetătorii utilizează cel mai frecvent profiluri SNP ale lociurilor ADNmt și ale cromozomului Y pentru studiile lor evolutive și de linie genetică.

Interpretarea profilurilor ADN

După generarea unui profil ADN, este necesar să se evalueze semnificația acestuia. Într-o investigație criminalistică tipică, profilul obținut de la un suspect este comparat cu profilul corespunzător unui eșantion dintr -o investigație la locul faptei sau cu profiluri deja stocate într - o bază de date ADN . Dacă profilul suspectului nu se potrivește cu eșantionul sau cu intrările din baza de date , anchetatorii pot concluziona că suspectul nu este sursa eșantionului sau a probelor din care au fost obținute celelalte profiluri . Cu toate acestea , dacă profilul suspectului se potrivește cu eșantionul sau cu o intrare din baza de date , interpretarea este mai complexă . În acest caz , am putea concluziona că cele două profiluri provin de la aceeași persoană sau că provin de la două persoane diferite care se întâmplă să aibă același profil ADN . Pentru a determina semnificația oricărei potriviri între profilurile ADN , este necesar să se estimeze probabilitatea ca două profiluri să se potrivească din pură întâmplare.

Metoda probabilității de profilare , sau probabilitatea de potrivire aleatorie , oferă o probabilitate numerică ca o persoană selectată aleatoriu dintr -o populație să aibă același profil ADN ca și proba sau suspectul din dosarul criminal . Următorul exemplu arată cum se determină probabilitatea de profilare (Tabelul CEI.2).

Primul locus examinat în acest profil ADN (D5S818) are două alele: 11 și 13. Studiile populaționale arată că alela 11 la acest locus apare cu o frecvență de 0,361 în *această* populație și că alela 13 apare cu o frecvență de 0,141. În genetica populațiilor , frecvențele a două alele diferite la un locus sunt desemnate ca p și q, conform

TABLA CE 1.2 Cálculo de una probabilidad de perfil basada en el análisis de cinco loci STR

Locus STR	Alelos del perfil	Frecuencia del alelo en la base de datos de población*	Cálculo de la frecuencia genotipica
D5S818	11	0,361	2pq = 2 X 0,361 X 0,141 = 0,102
	13	0,141	
TPOX	11	0,243	p2 = 0,243 X 0,243 = 0,059
	11	0,243	
D8S1179	13	0,305	2pq = 2 X 0,305 X 0,031 = 0,019
	16	0,031	
CSF1 PO	10	0,217	p2 = 0,217 X 0,217 = 0,047
	10	0,217	
D19S433	13	0,253	2pq = 2 X 0,253 X 0,369 = 0,187
	14	0,369	
Frecuencia genotípii	ca correspondiente a este	perfil de 5 loci = 0,102 X 0,059 X 0,019	X 0,047 X 0,187 = 0,0000009 = 9 X 10"

• Una base de datos de población caucásica de Estados Unidos (Butler, J. M., et al. 2003. J. Forensic Sci. 48: 908-911.)

legii Hardy- Weinberg descrise în Capitolul 25. Presupunem că persoana cu acest profil ADN a primit alelele 11 și 13 aleatoriu de la fiecare părinte. Prin urmare, probabilitatea ca această persoană să fi primit alela 11 de la mamă și alela 13 de la tată este exprimată ca $p \times q = pq$. În plus, probabilitatea ca persoana să fi primit alela 11 de la tată și alela 13 de la mamă este , de asemenea, pq . Prin urmare , probabilitatea totală ca această persoană să aibă aleatoriu

Genotipul 11, 13 la acest locus este *2pq*. După cum vedem în tabelul CE1.2, *2pij* este 0,102 sau aproximativ 10% . Este evident, având această probă, că utilizarea unui profil ADN la un singur locus nu ne-ar oferi prea multe informații, deoarece aproximativ 10% din populație ar avea, de asemenea, genotipul 11, 13 D5S818.

Puterea discriminatorie a profilului ADN crește pe măsură ce adăugăm mai mulți loci la analiză. Următorul locus din profilul ADN al acestei persoane (TPOX) are două alele identice - alela 11. Alela 11 apare cu o frecvență de 0,243 în această populație. Probabilitatea de a moșteni alela 11 de la fiecare părinte este $p \times p = p^2$. După cum putem vedea în tabel, frecvența genotipică la acest locus ar fi de 0,059, ceea ce este echivalent cu aproximativ 6% din populație . Dacă acest profil ADN ar conține doar primele două loci, am putea calcula frecvența cu care o persoană selectată aleatoriu din această populație ar avea genotipul prezentat în tabel; pentru a face acest lucru, am înmulți cele două probabilități genotipice. Aceasta ne-ar da $0,102 \times 0,059 = 0,006$. Această analiză ar implica faptul că aproximativ 6 din 1.000 de persoane (sau 1 din 166) ar avea acest genotip. Metoda de multiplicare a tuturor frecvențelor genotipurilor la fiecare locus este cunoscută sub numele de regula produsului. Este cea mai frecvent utilizată metodă pentru interpretarea - profilurilor ADN și este larg acceptată în instanțele din Statele Unite și din alte țări.

Înmulțind toate probabilitățile genotipice ale celor cinci loci, obținem o frecvență genotipică pentru acest profil ADN de 9×10^{-7}. Aceasta înseamnă că aproximativ 9 persoane din fiecare 10 milioane (sau aproximativ 1 persoană la un milion) selectate aleatoriu din această populație ar împărtăși acest profil ADN cu cinci locusuri.

Unicitatea profilurilor ADN

Pe măsură ce creștem numărul de loci analizați într-un profil ADN, obținem probabilități din ce în ce mai mici de potrivire aleatorie. Teoretic, dacă s-ar analiza un număr suficient de loci, am putea fi *aproape* siguri că profilul ADN este unic. În prezent, agențiile de securitate din SUA utilizează un set fundamental de 13 loci STR pentru a genera profiluri ADN. Un genotip ipotetic compus din cele mai comune alele ale fiecărui locus STR din profilul STR fundamental ar apărea o singură dată într-o populație de 10 miliarde de oameni. Prin urmare, frecvența acestui profil ar fi de una la 10 miliarde. Deși acest lucru ar sugera că majoritatea profilurilor ADN generate prin analiza celor 13 loci STR fundamentali ar fi distincte la nivel global, mai multe situații pot modifica această interpretare. De exemplu, gemenii identici au același ADN, iar profilurile lor ADN vor fi identice. Gemenii identici apar la o frecvență de 1 la 250 de nașteri. În plus, frații pot avea în comun o alelă la orice locus ADN în aproximativ 50 % din cazuri și pot avea în comun ambele alele la un locus în aproximativ 25% din cazuri. Părinții și copiii au , de asemenea, alele în comun, dar este mai puțin probabil ca aceștia să aibă ambele alele la același locus decât frații. Atunci când profilurile ADN provin de la doi indivizi strâns înrudiți , probabilitățile profilului trebuie ajustate pentru a ține cont de acest lucru . Calculele și frecvențele descrise aici se bazează pe presupunerea unei dimensiuni mari a populației și a unei înrudiri sau consangvinități reduse. Dacă profilul ADN este analizat de la un individ aparținând unui grup mic, interînrudit , calculele și tabelele privind frecvența alelelor pot să nu fie aplicabile.

Eroarea procurorului

Uneori se afirmă, atât în rândul profesioniștilor din domeniul juridic , cât și al publicului larg, că „ suspectul trebuie să fie vinovat, având în vedere că probabilitatea unei potriviri aleatorii cu eșantionul de la locul crimei este de 1 la 10 miliarde - mai mult decât populația Pământului”. Acest tip de afirmație este cunoscut sub numele de eroarea procurorului, deoarece echivalează vinovăția cu o probabilitate numerică obținută dintr-o anumită probă, în absența - altor dovezi. O potrivire între profilul ADN al suspectului și un eșantion obținut la locul crimei nu dovedește neapărat vinovăția, din mai multe motive, de la eroarea umană și contaminarea probei până la chiar manipularea deliberată a probelor . De asemenea, un profil ADN care nu corespunde cu cel obținut din test nu implică neapărat că suspectul este nevinovat. De exemplu, profilul unui suspect poate să nu corespundă cu cel al unui eșantion de spermă obținut la locul unui viol , dar suspectul ar fi putut fi totuși implicat în infracțiune, eventual imobilizând victima. Din acest motiv și din altele , profilurile ADN trebuie interpretate în contextul tuturor probelor obținute în caz . Descrieri mai detaliate ale problemelor legate de profilarea ADN sunt furnizate în secțiunea următoare .

Baze de date cu profiluri ADN

baze de date naționale cu profiluri ADN . Prima dintre aceste baze de date a fost înființată în Regatul Unit în 1995 și conține acum peste cinci milioane de profiluri - reprezentând aproape 10% din populație. În Regatul Unit, probele de ADN pot fi prelevate de la oricine este arestat pentru o infracțiune care ar putea atrage după sine o pedeapsă cu închisoarea. Deși această politică este foarte controversată,

Profilurile ADN ale suspecților pot fi stocate permanent în baza națională de date ADN, chiar dacă persoana nu este condamnată.

În Statele Unite, atât agențiile statale, cât și cele federale mențin baze de date cu profiluri ADN . Sistemul complet de baze de date, împreună cu instrumentele pentru analiza datelor, este cunoscut sub numele de Sistemul Combinat de Index ADN (CODIS) și este administrat de FBI. La începutul anului 2010, existau peste 8 milioane de profiluri ADN stocate în sistemul CODIS. Cele două baze de date principale din cadrul CODIS sunt baza de date a infractorilor condamnați, care conține profiluri ADN ale persoanelor condamnate pentru anumite infracțiuni, și baza de date criminalistică, care conține profiluri derivate din probe colectate la locul crimei. În plus, unele state mențin baze de date cu profiluri ADN care conțin profiluri de suspecți, rămășițe umane neidentificate și persoane dispărute. Suspecții necondamnați pot solicita ca profilurile lor să fie eliminate din bazele de date.

Bazele de date cu profiluri ADN s-au dovedit utile în multe situații diferite. Până în ianuarie 2010, utilizarea bazelor de date CODIS a permis peste 100.000 de potriviri de profiluri, ceea ce a ajutat anchetele penale și căutarea persoanelor dispărute (Caseta 5). Însă, în ciuda valorii bazelor de date cu profiluri ADN, acestea continuă să reprezinte o preocupare pentru multe persoane care încearcă să găsească un echilibru între dreptul la viață privată și libertățile civile ale indivizilor și nevoile statului.

Probleme tehnice și etice legate de profilarea ADN-ului

Deși profilarea ADN este extrem de sensibilă, precisă și puternică, este important să fim conștienți și de limitele sale. O limitare este că, în majoritatea cazurilor penale, nu există dovezi pentru analiză sau dovezile ADN existente sunt irelevante pentru caz. În unele cazuri, există dovezi ADN potențial valoroase, dar nu sunt procesate și pur și simplu arhivate. O altă problemă serioasă este eroarea umană. Există cazuri în care au fost implicate persoane nevinovate.

RECUADRO 5
El caso de Kennedy Brewer: dos errores en las huellas de

En 1992, en Mississippi, Kennedy Brewer fue arrestado y acusado de la violación y asesinato de la hija de 3 años de edad de su novia, Christine Jackson. Aunque se había obtenido una muestra de semen del cuerpo de Christine, no había suficiente ADN para poder obtener un perfil. Los forenses fueron también incapaces de identificar el grupo sanguíneo ABO de las manchas de sangre encontradas en la escena del crimen. La única prueba de la acusación provenía de un especialista forense en odontología que testificó que las 19 «marcas de mordisco» encontradas en el cuerpo de Christine se correspondían con las huellas dejadas por los dos dientes superiores de Brewer. Aun cuando el especialista había sido desacreditado recientemente por el Colegio Americano de Odontología Forense, y a pesar de que el perito dentista que la defensa aportó testificó que las marcas encontradas en el cuerpo de Christine eran en realidad, picaduras de insecto postmortem, el tribunal condenó a Brewer por asesinato en primer grado y agresión sexual, y lo condenó a muerte.

En 2001, se realizó un perfil de ADN más sensible con la muestra de semen obtenida en 1992. El perfil excluyó a Brewer como donante de la muestra de semen. También excluyó a dos de los amigos de Brewer y los perfiles del cromosoma Y excluyeron a los familiares varones de Brewer. A pesar de los resultados de estas pruebas, Brewer permaneció en presión otros cinco años esperando un nuevo juicio. En 2007, el proyecto *Innocence Project* tomó cartas en el asunto de Brewer y volvió a comprobar las muestras de ADN. Los perfiles se correspondían con los de otro hombre, Justin Albert Johnson, que tenía un historial de agresiones sexuales y que había sido uno de los sospechosos originales del caso. Johnson confesó posteriormente el asesinato de Christine Jackson, así como otra violación y asesinato —la de una niña de 3 años llamada Courtney Smith. Levon Brooks, el exnovio de la madre de Courtney, había sido condenado por asesinato en el caso Smith, basándose también en el testimonio sobre mordeduras realizado por el mismo perito desacreditado.

El 15 de febrero de 2008, se retiraron todos los cargos contra Kennedy Brewer y fue exonerado de los crímenes. Levon Brooks fue también posteriormente exonerado del asesinato de Smith en marzo de 2008.

Desde 1989, más de 250 personas en Estados unidos han sido exoneradas de graves crímenes, basándose en las evidencias obtenidas a partir de perfiles de ADN. Diecisiete de estas personas llegaron a estar en el corredor de la muerte. En más de 100 de estos casos de exoneración, el verdadero perpetrador ha sido identificado, a menudo gracias a búsquedas realizadas en bases de datos de ADN.

Condamnați pentru infracțiuni violente pe baza unor probe de ADN care au fost schimbate din greșeală în timpul procesului. Probele de ADN obținute din probele colectate la locul crimei sunt adesea amestecuri provenite de la un număr nelimitat de persoane prezente la locul crimei sau chiar de la persoane care nu au fost prezente, dar al căror material biologic (cum ar fi părul sau saliva) a fost introdus indirect acolo. Probele colectate la locul crimei sunt adesea degradate, rezultând profiluri ADN parțiale care sunt dificil de interpretat.

Una dintre cele mai îngrijorătoare probleme ale profilării ADN este potențialul său de manipulare deliberată a probelor. Tehnologiile de profilare ADN sunt atât de sensibile încât este posibil să se genereze profiluri din doar câteva celule - și chiar din fragmente de ADN sintetic. Au existat cazuri în care infractorii au introdus materiale biologice în locurile crimei în încercarea de a influența profilurile ADN criminalistice. De asemenea, este posibil să se fabrice fragmente de ADN artificiale care corespund locusurilor STR din profilul ADN al unei persoane. În 2010, un articol de cercetare a raportat metode de sinteză a ADN-ului cu un profil STR cunoscut prin amestecarea ADN-ului cu fluide corporale și depunerea probei pe obiecte de la locul crimei. Supunerea acestor probe artificiale unei analize criminalistice de rutină a produs profiluri STR perfecte. În viitor, ar putea fi necesar să se dezvolte metode pentru a detecta prezența ADN-ului clonat sau sintetic în probele obținute de la locul crimei. S-a sugerat că o astfel de detectare ar putea fi efectuată pe baza faptului că ADN-ul natural conține markeri epigenetici, cum ar fi metilarea.

Multe întrebări etice legate de profilarea ADN se referă la colectarea și stocarea probelor biologice și a profilurilor ADN. Ar trebui ca poliția să poată colecta probe ADN fără știrea sau consimțământul suspectului? Cine ar trebui să stocheze profilurile ADN într-o bază de date? Ar trebui ca agențiile de aplicare a legii să dezvăluie identitățile persoanelor ale căror profiluri ADN corespund parțial cu cele ale unui suspect, profitând de posibilitatea ca cele două persoane să fie înrudite? Ar trebui ca cercetătorii să aibă acces la bazele de date ADN în scopuri de investigație? Ar putea fi profilurile ADN asociate cu regiuni ale genomului care ar putea dezvălui informații despre sănătatea, rasa sau aspectul unei persoane și, dacă da, ar fi aceasta o probă admisibilă în instanță?

Pe măsură ce mecanismele de profilare ADN devin tot mai sofisticate și mai răspândite, trebuie să analizăm cu atenție atât aspectele tehnice, cât și pe cele etice care înconjoară această - tehnologie modernă puternică.

Lecturi și resurse selectate

Articole de revistă

Bruiteli, TA, et al., 2009. Forensic science. *Anal. Chem* 81:4695-4711 .

Butler, JM și colab., 2007. STR vs. SNP-uri: Reflecții despre viitorul testării ADN în domeniul criminalistic. *Forensic Sci Med Pathol* 3: 200-205.

Frumkin, D. și colab., 2010. Autentificarea probelor de ADN criminalistice. *Forensic Sci International* 4: 95-103.

Gill, R, Jeffreys, AJ și Werrett, DJ 2005. Aplicații criminalistice ale «amprentelor» ADN. *Nature 318:* 577-579.

Houck, MM 2006. CSI: Realitate. *Scientific American* 295(1): 84-89.

Jobling, MA și Gill, P. 2004. Dovezi codificate: ADN-ul în analiza criminalistică. *Nature Reviews Genetics* 5: 739-750.

King, TE și colab. 2007. Cromozomul Y al lui Thomas Jefferson aparține unei linii genealogice europene rare. *Am J Phys Anthropology* 132:584-589.

Roewer, L. 2009. Tipizarea STR a cromozomului Y în cazurile de criminalitate. *Forensic Sci Med Pathol.* 5(2): 77-84.

Utilizarea criminalistică a ADN-ului: o poveste de succes științific, un câmp minat etic. *Biotechnol 1* 3: 303-305.

Site-uri web

Brenner, CH, Matematică criminalistică a potrivirii ADN-ului . http://dna-view.com/profile.htm

Butler, JM și Reeder, DJ Baza de date internet cu ADN cu repetiții scurte în tandem . http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/

Wikipedia: Profilare ADN . http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_pro- filing

Inițiativa ADN : promovarea justiției penale prin tehnologia ADN. http://www.dna.gov

Proiectul Inocență, http://www.innocenceproject.org

Berson, SB Debating ADN collection, din Office of Justice Programs , National Institute of Justice Journal, noiembrie 2009. http://w5vw.nij.gov/journals/264/debating-DNA.htm

Statistici CODIS-NDIS. Site-ul web al Biroului Federal de Investigații, http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/clickmap.htm

[1] Frumkin, D. și colab. 2010. Autentificarea probelor de ADN criminalistice. *Forensic Sci Int Genetics* 4:95-103.

CAPITOLELE SPECIALE DESPRE GENETICA MODERNĂ

CAPITOLUL SPECIAL 2

Genómica y medicina

En un futuro próximo, los perfiles genómicos y la medicina personalizada permitirán a los médicos predecir qué enfermedades vamos a desarrollar, qué terapias funcionarán adecuadamente con nosotros y qué dosis de fármacos resultarán apropiadas.

Medicii au practicat întotdeauna medicina personalizată - pentru a lua decizii eficiente cu privire la tratamentul pe care pacienții ar trebui să îl primească . Medicii iau în considerare simptomele pacientului , istoricul familial , stilul de viață și datele obținute prin numeroase tipuri de teste medicale . Cu toate acestea, în ultimii 20 de ani, medicina personalizată a luat o direcție nouă, potențial foarte promițătoare, bazată pe genetică și genomică . Astăzi, sintagma „ medicină personalizată" este folosită pentru a descrie prevalența tot mai mare *a medicinei personalizate.* Este utilizată pentru a descrie aplicarea informațiilor obținute din profilul genetic distinctiv al unui pacient, pentru a selecta tratamente eficiente care au efecte secundare minime și pentru a detecta susceptibilitatea la boli înainte ca acestea să înceapă să se dezvolte.

În ciuda cantităților vaste de informații medicale și produse farmaceutice disponibile, diagnosticarea și tratarea bolilor umane rămâne un proces imperfect. Diagnosticarea precisă a anumitor tulburări este uneori dificilă sau imposibilă . În plus , unii pacienți nu răspund la tratamente , în timp ce alții pot prezenta efecte secundare supărătoare sau chiar periculoase . Întrucât o mare parte din susceptibilitatea la boli și variația răspunsului pacientului la tratamentele medicamentoase sunt determinate genetic , progresele în genetică , genomică și biologie moleculară ar putea îmbunătăți semnificativ tehnicile de diagnostic și tratament .

Secvențierea genomului uman , catalogarea variantelor de secvențe genetice și stabilirea legăturilor dintre variantele de secvențe și susceptibilitatea la boli formează baza domeniului emergent al medicinei personalizate . În 2009 , numărul de boli detectabile prin testare genetică a ajuns la aproximativ 2.000 . În plus , o listă de teste genetice în creștere rapidă îi ajută pe medici să determine dacă un pacient va avea o reacție adversă la un medicament sau dacă un anumit medicament va fi eficient pentru acel pacient.

Deși o mare parte din potențialul promițător al medicinei personalizate rămâne o posibilitate viitoare, se înregistrează progrese semnificative. Pe măsură ce tehnologiile genomice avansează și costul secvențierii genomului unei persoane scade, devine din ce în ce mai ușor să se examineze profilul genomic unic al unui pacient pentru a diagnostica bolile și a prescrie tratamente. Susținătorii medicinei personalizate își imaginează un viitor în care secvența genomică a fiecărui individ va fi determinată la naștere și stocată digital într -un dosar medical personal computerizat . Profesioniștii din domeniul medical vor utiliza metode automate pentru a explora informațiile despre secvența genetică conținute în aceste înregistrări, căutând indicii despre susceptibilitatea la boli și reacțiile la medicamente . În viitorul apropiat, profilurile genomice și medicina personalizată vor permite medicilor să prezică ce boli vom dezvolta , ce terapii vor funcționa bine pentru noi și ce doze de medicamente vor fi adecvate.

În acest capitol special, vom rezuma utilizările actuale ale medicinei personalizate bazate pe genetică și genomică în diagnosticarea bolilor și selectarea medicamentelor. De asemenea, vom schița direcțiile viitoare ale medicinei personalizate și vom ridica câteva probleme tehnice și etice asociate cu această disciplină.

Medicină personalizată și farmacogenomică

medicinei personalizate este farmacogenomica . Farmacogenetica este studiul modului în care structura genetică generală a unui individ determină răspunsul organismului său la medicamente. Termenul *de farmacogenomică* este folosit interschimbabil cu cel de farmacogenetică . care se referă la studiul modului în care variațiile de secvență din cadrul unor gene candidate specifice afectează răspunsurile individuale la medicamente.

În farmacogenomică, oamenii de știință iau în considerare numeroase aspecte ale metabolismului medicamentelor și modul în care trăsăturile genetice afectează aceste aspecte. Când un medicament intră în organism, acesta interacționează cu diverse proteine , inclusiv purtători, receptori de suprafață celulară, transportori și enzime metabolice. Aceste proteine afectează locul de acțiune prevăzut al medicamentului, absorbția acestuia , răspunsul farmacologic , descompunerea și excreția sa . Deoarece au loc atât de multe interacțiuni între un medicament *și* proteinele din corpul pacientului, multe gene și numeroase polimorfisme genetice pot afecta răspunsul unui individ la un medicament.

În această subsecțiune, vom examina două moduri în care genomica și medicina personalizată schimbă domeniul farmacogenomicii: optimizarea terapiilor medicamentoase și reducerea reacțiilor adverse la medicamente.

Optimizarea terapiilor farmacologice

În ceea ce privește terapiile medicamentoase, este clar că o abordare universală nu este posibilă . În medie, un medicament va fi eficient doar la aproximativ 50% dintre pacienții cărora li se administrează (Figura CE2.1). Aceasta înseamnă că medicii trebuie adesea să schimbe medicamentul pe care îl prescriu unui pacient până când găsesc unul eficient. Acest lucru nu numai că irosește timp și resurse, dar poate fi și periculos pentru pacient, care este expus la mai multe medicamente diferite și este posibil să nu primească tratamentul adecvat la timp pentru a combate o boală progresivă.

Farmacogenomica crește eficacitatea medicamentelor permițând direcționarea acestora către subpopulații de pacienți care vor beneficia de administrarea lor. Una dintre cele mai comune aplicații actuale ale farmacogenomicii personalizate este în diagnosticarea și tratamentul cancerelor. Studiile de secvențiere la scară largă arată că fiecare tumoră este unică din punct de vedere genetic.

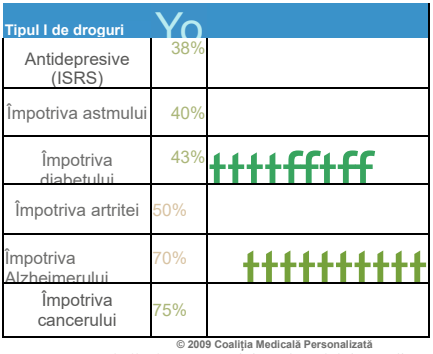


FIGURA CE2.1 Variații ale răspunsului pacientului la medicamente. Tabelul oferă un rezumat general al procentului de pacienți pentru care o anumită clasă de medicamente este eficientă.

unică, deși poate fi clasificată într-o categorie largă bazată pe analize citologice și pe cunoașterea originii sale tisulare . Având în vedere această variabilitate genomică, este important să înțelegem profilul mutațional al fiecărui pacient pentru a selecta un tratament adecvat - în special când vorbim despre cele mai recente tratamente bazate pe caracteristicile moleculare ale tumorilor (Caseta 1).

Una dintre primele povești de succes în domeniul medicinei personalizate a fost cea a genei *HER-2* și utilizarea medicamentului Herceptin* în cancerul de sân. Gena receptorului 2 al factorului de creștere epidermal uman (HER-2) este situată pe cromozomul 17 *și* codifică o proteină receptor transmembranară a tirozin kinazei numită HER-2. Acești receptori sunt situați pe membranele celulare ale celulelor epiteliale mamare normale și sunt responsabili de trimiterea de semnale către nucleul celular care declanșează transcripția genelor implicate în creșterea și diviziunea celulară . În circumstanțe normale , un factor de creștere extracelular (ligand) se leagă de o proteină HER-2 , care apoi dimerizează cu un alt receptor din familia HER și fosforilează reziduurile de tirozină de pe proteine țintă specifice din interiorul celulei . Aceste proteine fosforilate sunt apoi activate și fosforilează o serie de alte proteine într-un proces cunoscut sub numele de transducție a semnalului . Rezultatul final al acestei cascade de transducție a semnalului este că factorii de transcripție din nucleu stimulează transcripția genelor ale căror produse reglează proliferarea celulară .

În aproximativ 25 % din cazurile de cancer mamar invaziv, gena HER - 2 Gena este amplificată , iar proteina este supraexprimată pe suprafața celulei. În unele cazuri de cancer mamar, sunt prezente până la 100 de copii ale genei *HER-2* per celulă. Prezența amplificării genei *HER-2* este asociată cu o invazivitate tumorală crescută , metastaze și proliferare celulară, precum și cu o agravare a prognosticului pacientei .

Folosind tehnologia ADN-ului recombinant, Genentech Corporation, o companie cu sediul în California , a dezvoltat un anticorp monoclonal cunoscut sub numele de trastuzumab (sau Herceptin*), conceput să se lege specific de regiunea extracelulară a receptorului HER-2. Prin legarea la receptor, Herceptin* pare să inhibe capacitatea de semnalizare a HER -2 și poate, de asemenea, marca celula care exprimă HER-2 pentru distrugere de către sistemul imunitar al pacientului .

CUTIA 1

Povestea Crizotinibului de la Pfizer

ȘI

În 2007, Beverly Sotir a fost diagnosticată cu carcinom pulmonar non-miocelular - (NMSC) avansat. Beverly, o bunică în vârstă de 68 de ani și nefumătoare , a primit chimioterapie standard, dar cancerul ei a continuat să se răspândească. I s-au dat șase luni de trăit. Cam în aceeași perioadă, un studiu științific aparent fără legătură era în desfășurare la compania farmaceutică Pfizer . Pfizer dezvoltase un compus numit crizotinib, care era conceput pentru a inhiba activitatea MET, o tirozin kinază anormală în diferite tumori. Deși crizotinib a inhibat și o altă kinază numită ALK (kinaza limfomului anaplazic), oamenii de știință nu au considerat acest lucru semnificativ. După începerea studiilor clinice cu crizotinib, a fost publicată o lucrare* care descrie o translocație cromozomială - prezentă într-un număr mic de tipuri de cancer NSCLC . Această translocație a determinat fuziunea genei *ALK* cu o altă genă numită *EML4*. Aceasta a dus la producerea unei proteine de fuziune care a stimulat creșterea celulelor canceroase . Pfizer și-a modificat imediat studiul clinic pentru a include pacienți cu NSCLC . Medicii lui Beverly de la Institutul de Cancer Dana-Farber din Boston i-au testat tumorile , au descoperit că acestea conțineau gena de fuziune *ALK/EML4* și au ales-o pe Beverly pentru studiile clinice. Rezultatele au fost spectaculoase. În șase luni, tumorile lui Beverly s-au micșorat cu peste 50 % , iar unele au dispărut complet . În septembrie - 2010 , Beverly era încă în progresie.

Rezultatele studiilor clinice de fază I și II cu crizotinib au arătat că tumorile s-au micșorat sau s-au stabilizat la 90 % dintre cei 82 de pacienți ale căror tumori conțineau gena de fuziune ALK . Pacienții care au răspuns bine la tratament au prezentat un răspuns pozitiv pentru perioade de până la 15 luni. Oamenii de știință au raportat că gena de fuziune *ALK* tinde să apară mai frecvent la pacienții tineri cu NSCLC care nu au fumat niciodată. Aproximativ 4 % dintre pacienții cu NSCLC prezintă această translocație în celulele tumorale . Deși procentul de persoane care ar putea beneficia de crizotinib poate părea mic , aceasta înseamnă că - aproximativ 45.000 de persoane din întreaga lume ar fi eligibile pentru acest tratament în fiecare an . Crizotinib se află în prezent în studii clinice de faza III .

În celulele canceroase care supraexprimă HER-2, tratamentul cu Herceptin provoacă oprirea ciclului celular și, în unele cazuri, moartea celulelor canceroase.

Întrucât Herceptin acționează doar asupra celulelor canceroase de sân care au amplificat *genele HER2,* este important să se cunoască fenotipul HER2 al fiecărui cancer. În plus, Herceptin are efecte secundare potențial grave . Prin urmare, utilizarea sa ar trebui limitată la pacientele care pot beneficia de tratament. Au fost dezvoltate mai multe teste moleculare pentru a determina starea genelor și proteinelor celulelor canceroase de sân. Două dintre cele mai frecvent utilizate teste se bazează pe imunohistochimie (IHC) și hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH). În testele IHC, un anticorp care se leagă de moleculele de proteină HER2 este adăugat la un țesut prefixat pe o lamă. Anticorpul este atașat la o altă moleculă care reacționează pentru a produce o colorare detectabilă vizual. După spălare și colorare, țesuturile sunt examinate la microscop. Nivelul de colorare HER-2 este evaluat de la 0 (mai puțin de 20.000 de molecule HER-2 per celulă) până la +3 (aproximativ două milioane de molecule per celulă), vezi Figura CE2.2(a). În FISH, moleculele de ADN sau ARN care prezintă complementaritate de secvență cu secvența genei *HER-2* sunt adăugate în țesutul fixat pe placă . Aceste sonde de ADN sau ARN sunt marcate cu o moleculă marker fluorescentă. După hibridizarea sondelor la țesut și spălarea excesului de produs sondă, locația și intensitatea sondei sunt determinate prin observarea țesutului la un microscop cu fluorescență . Numărul de gene *HER-2* este determinat prin compararea semnalului fluorescent al sondei *HER-2* cu un semnal de control de la o altă genă care nu este amplificată în celule [Figura CE2.2(b)].

Herceptin a avut un impact major asupra tratamentului cancerelor de sân HER2-pozitiv. Atunci când este utilizat în combinație cu chimioterapia, Herceptin crește ratele de supraviețuire cu 25 până la 50% comparativ cu chimioterapia administrată singură. Herceptin este acum unul dintre cele mai bine vândute produse biotehnologice din lume , generând peste 5 miliarde de dolari în vânzări anuale.

În prezent, există zeci de medicamente a căror prescriere și utilizare depind de statutul genetic al celulelor țintă. Aproximativ 10% dintre medicamentele aprobate de FDA în Statele Unite au etichete care includ informații farmacogenomice (Tabelul CE2.1). De exemplu, aproximativ 40 % dintre pacienții cu cancer colorectal răspund la medicamentele Erbitux (cetuximab) și Vectibix (panitumab). Aceste două medicamente sunt anticorpi monoclonali care se leagă de receptorii factorului de creștere epidermală (EGFR) de pe suprafața celulei, inhibând calea de transducție a semnalului EGFR. Pentru a fi eficiente, celulele canceroase trebuie să fie capabile să exprime EGFR pe suprafața lor și trebuie să posede, de asemenea, o genă *K - RAS* de tip sălbatic . Codifică o mică proteină de semnalizare care face parte din calea EGFR. Mutațiile din codonii 12, 13 și 61 ai *K-RAS* sunt frecvente în cancerele colorectale, iar prezența acestor mutații face ca tratamentul cu

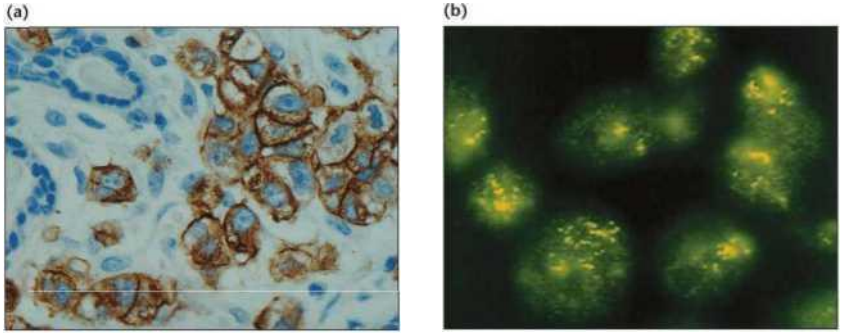


TABLA Œ2.1 Exemple de diagnostice și medicamente personalizate

Terapie	Testarea genetică	Descriere
Herceptin® (trastuzumab)	Amplificarea *HER-2*	Screening pentru cancerul de sân însoțitor de utilizarea Herceptin. Analiza proteinelor și a mutațiilor înainte de tratament.
Erbitux® (cetuximab)	Expresia *ECFR* , mutațiile *K RAS*	
Gleevec® (imatinib)	Fuziunea *BCR/ABL*	Gleevec este utilizat în tratamentul leucemiei mieloide cronice asociate cromozomului Philadelphia .
Gleevec® (imatinib)	*C-KIT*	Gleevec este utilizat în cancerele de stomac care exprimă C-KIT mutat . Cancer pulmonar, pentru tumorile EGFR1.
Tarceva* (erlotinib)	Expresia *EGFR*	Mutații genetice legate de cancerul de colon. Selecția pacientelor cu cancer de sân pentru chimioterapie. Clasifică 39 de tipuri de tumori folosind teste de expresie genică. Detectează variante CD20, permițând prezicerea răspunsului la rituximab în limfoamele non-Hodgkin.
Medicamente/ intervenții chirurgicale	MLH1, MSH2, MSH6 Aviara*	
Hormoni/chimioterapie	Oncotype DX® Cancer TYPE	
Chimioterapie Rituximab	ID PGx Predict® *(FcRIIIa)*	

Este posibil ca aceste medicamente să nu fie eficiente. Înainte de tratamentul cu Erbitux sau Vectibix, celulele tumorale ale pacienților sunt analizate pentru a verifica prezența EGFR și a unei gene *K -RAS de tip sălbatic* . EGFR este detectat printr-un test imunohistochimic , cum ar fi cel descris pentru HER-2. Mutațiile K *-RAS sunt detectate utilizând un* test bazat pe reacția în lanț a polimerazei (PCR) . Metoda PCR este descrisă în Capitolul 20. Testul *K-RAS* Această metodă se bazează pe observația că ADN polimeraza *Taq* poate distinge între o potrivire perfectă cu primerul și o eroare de nucleotidă unică la capătul 3' al primerului. Prin includerea primerilor care hibridizează perfect doar cu mutații la codonii 12, 13 sau 61, PCR va amplifica doar genele *K-RAS* mutate . Primerii sunt marcați cu o moleculă fluorescentă, iar prezența unui produs PCR este vizualizată folosind echipamente automate.

Un alt exemplu de decizii de tratament ghidate de testarea genetică este testul Oncotype DX* (Genomic Health Inc.). Acest test analizează expresia (cantitatea de ARNm) a 21 de gene din probele de cancer mamar pentru a ajuta medicii să selecteze - tratamentele adecvate și să prezică evoluția bolii. Aceste gene au fost alese deoarece nivelurile lor de expresie sunt corelate cu recurența cancerului mamar după tratamentul inițial. Pentru a efectua testul, oamenii de știință extrag acizii nucleici din țesutul tumoral și îndepărtează ADN-ul prin tratarea probei cu enzima DNază I. Apoi , transformă moleculele de ARNm în molecule de ADN monocatenar (ADNc) folosind transcriptază inversă. ADNc-ul este amplificat prin reacții PCR folosind primeri specifici fiecăreia dintre cele 21 de gene. Această tehnică, cunoscută sub numele de PCR cu transcriptază inversă (RT-PCR), este descrisă în detaliu în Capitolul 20. Nivelul de amplificare al fiecărui ADNc în timpul reacției PCR reflectă concentrația sa. Pe baza nivelurilor de expresie a ARNm relevate de test, oamenii de știință calculează un „scor de recurență", estimând probabilitatea recurenței cancerului în termen de zece ani . Pacienții cu un scor de risc scăzut probabil nu ar beneficia de adăugarea chimioterapiei la schemele lor de tratament și, prin urmare, ar putea fi tratați doar cu hormoni. Cei cu scoruri de risc mai mari ar beneficia probabil de terapii mai agresive.

Reducerea reacțiilor adverse la medicamente

În fiecare an, aproximativ două milioane de persoane din Statele Unite se confruntă cu efecte secundare grave din cauza produselor farmaceutice , iar aproximativ 100.000 dintre acestea decedează. Costurile asociate cu aceste reacții adverse la medicamente (RAM) sunt estimate la aproximativ 136 de miliarde de dolari anual . În timp ce unele RAM rezultă din utilizarea necorespunzătoare a medicamentelor , altele sunt rezultatul reacțiilor fiziologice inerente ale pacienților la medicamente.

Variațiile de secvență într-un număr mare de gene pot afecta răspunsul la medicamente (Tabelul CE2.2). De o importanță deosebită sunt genele care codifică familiile de enzime ale citocromului P450. Membrii acestei familii sunt codificați de 57 de gene distincte . Produșii genelor CYP2A6 *, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1* și *CYP3A4* sunt responsabili de metabolizarea majorității produselor farmaceutice importante clinic . Persoanele cu anumite variante ale acestor gene metabolizează și elimină medicamentele lent , ceea ce poate duce la acumularea de medicamente și la apariția reacțiilor adverse.

TABLA CE2.2

Producto gènico	Fenotipo variante	Fármacos afectados	Respuesta
Aceti Itransferasa NAT2	Acetiladores lentos, rápidos	Isoniacida, sulfametacina, dapsona, ácido paraminosalicílico, aminas heterocíclicas 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina	Lenta: neuritis tóxica, lupus eritematoso, cáncer de vejiga; Rápida: cáncer colorrectal Toxicidad sobre la médula ósea, daño hepático
Tiopurina metiltransferasa	Mediadores lentos de TPMT	Levodopa, metil*dopa	Respuesta reducida o incrementada
Catecol O-metiltransferasa		Mefenitoina, hexobarbital, proguanil, etc.	Toxicidad reducida o incrementada,
CYP2C19	Metiladores rápidos, lentos	Albuterol, ventolin	baja eficacia (proguanil) Control reducido del asma
Adrenoceptor {i2	Hidroxiladores lentos, extensivos	Clozapina	Eficiencias variables en los fármacos
Receptor serotoninérgico 5-HT2A	Subregulación mejorada del receptor	Vinblastina, doxorubicina, paclitaxel, etc.	Resistencia a los fármacos
Tranportador de resistencia a múltiples fármacos	Múltiples polimorfismos		
	Sobreexpresión en el cáncer		

Exemple de produse genetice variante care afectează răspunsul la medicamente

Sursa: adaptat din Tabelul 1 din Mancinelli, L. și colab. 2000. Farmacogenomică: Promisiunea medicinei personalizate. AAPS PharmSci 2(1): Articolul 4.

Efecte secundare ale supradozajului. În schimb, alte persoane au variante genetice care determină eliminarea rapidă a medicamentelor, reducându-le eficacitatea. Un exemplu de variante genetice care afectează răspunsul la medicamente este cel al *CYP2D6.* Acest membru al familiei citocromului P450 codifică enzima debrisochină hidroxilază, care este implicată în metabolismul a aproximativ 25% din toate produsele farmaceutice, inclusiv diazepam, acetaminofen, clozapină, beta-blocante, tamoxifen și codeină. Există peste 70 de alele variante ale acestei gene. Unele mutații reduc activitatea enzimei, în timp ce altele o pot crește.

Aproximativ 80 % dintre oameni sunt homozigoți sau heterozigoți pentru gena *CYP2D6* de tip sălbatic, iar acești indivizi sunt cunoscuți sub numele de metabolizatori extensivi (Figura CE2.3). Aproximativ 10 până la 15% dintre persoane sunt homozigote pentru alelele care reduc activitatea (metabolizatori lenți), în timp ce restul populației are gene duplicate (metabolizatori ultrarapizi) . Metabolizatorii lenți prezintă un risc mai mare de reacții adverse la medicamente (RAM) , în timp ce metabolizatorii ultrarapizi pot să nu primească doze suficiente de medicamente pentru a avea un efect asupra afecțiunilor lor .

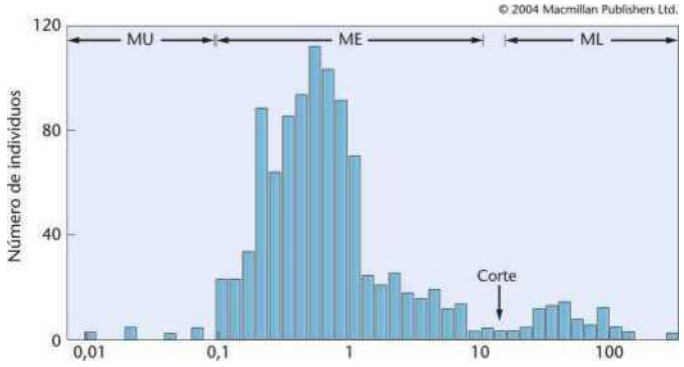


FIGURA CE2.3 Perfil farmacogenético de CYP2D6 en una población sueca. Se comprobó la capacidad de los individuos para metabolizar la debrisoquina en 4-hidroxidebrisoquina, como indicación de la eficiencia de la actividad de la enzima debrisoquina hidroxilasa. La muestra de población fue dividida en las categorías MU (metabolizadores ultrarrápidos), ME (metabolizadores extensivos) y ML (metabolizadores lentos). La etiqueta «corte» indica el corte entre los metabolizadores extensivos y lentos.

Un alt exemplu de variante genetice care afectează - metabolismul medicamentelor este enzima tiopurin S-metiltransferază (TPMT), codificată de gena *TPMT* . Această enzimă metabolizează un număr mare de medicamente, inclusiv - multe medicamente psihotrope și tiopurine utilizate pentru tratarea cancerului. Există peste 28 de variante alelice ale acestei gene, majoritatea fiind polimorfisme cu un singur nucleotid (SNP) care creează substituții de aminoacizi, rezultând o activitate enzimatică redusă. În prezent, sunt disponibile teste genetice și enzimatice pentru a detecta variațiile activității TPMT, permițând ajustarea dozelor terapeutice pentru fiecare pacient în parte. Variantele TPMT și efectele acestora sunt, de asemenea, discutate în Capitolul 22.

În 2005, FDA a aprobat un test genetic cu microcip numit AmpliChip CYP450 (Roche Diagnostics) care detectează 29 de variante genetice a două gene - *CYP2D6* și *CYP2C19.* Acest test detectează polimorfisme SNP, precum și deleții și duplicări genetice. Testul AmpliChip CYP450 este un exemplu de test de genotipare cu microcip, precum cele descrise în Capitolul 22. Pentru a efectua testul, ADN-ul este extras dintr-o probă de sânge a pacientului . Genele *CYP2D6* și *CYP2C19 sunt* amplificate din proba de ADN folosind amestecuri de primeri specifici genei și amplificare PCR . După...

În amplificarea PCR, produsele de amplificare sunt tăiate în fragmente scurte (50–200 nucleotide) folosind digestie parțială cu enzima DNază I. Fragmentele scurte de ADN amplificate sunt marcate la capetele *3′* cu biotină. În etapa următoare, fragmentele marcate cu biotină sunt hibridizate cu microcip. Microcipul este o suprafață de sticlă de 20 x 20 pm care conține aproximativ 15.000 de oligonucleotide sintetice diferite (numite sonde), aranjate într-un model de grilă specific (Figura CE2.4). Fiecare situs al sondei conține până la copii 10' ale unei sonde specifice. Secvențele sondei sunt complementare variațiilor de secvență cunoscute ale celor două gene. Fragmentele de ADN amplificate prin PCR hibridizează cu microcip la temperaturi care permit potriviri perfecte între sonde și fragmentele de ADN. După spălarea excesului de ADN amplificat, prezența produselor de amplificare hibridizate este vizualizată prin colorarea microcipului cu un colorant fluorescent care se leagă de moleculele de biotină. Un scaner automat detectează locația ADN-ului colorat, iar intensitatea colorării reflectă cantitatea de ADN hibridizat cu fiecare sondă. După scanare, datele sunt analizate cu ajutorul unui software și se generează genotipul *CYP2D6/CYP2C19 al individului* .

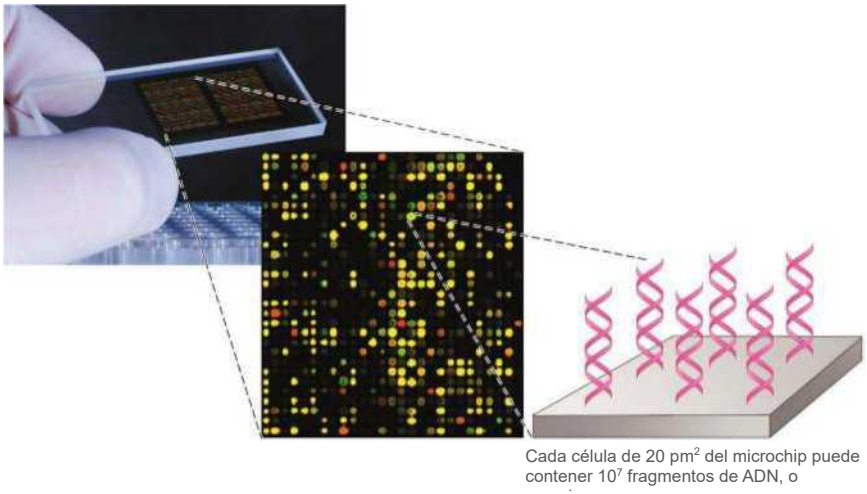


FIGURA CE2.4 Ilustraciones de un microchip de ADN. El cartucho del microchip se muestra a la izquierda, mientras que en el centro aparece una versión aumentada del microchip. El microchip de 20-pm² contiene sondas de oligonucleótidos sintéticos complementarias al ADN de las vanantes génicas de *CYP2D6 y CYP2C19.* Cada tipo de sonda está ubicado en una región específica del microchip, denominada célula de sondeo. Cada célula de sondeo contiene aproximadamente 10^7 copias de la sonda. Después de la hibridación, el lavado *y* el teñido, se escanea el microchip con un láser. La cantidad de luz emitida por cada producto de amplificación por PCR fluorescente es proporcional a la cantidad de producto unido a las sondas en esa célula de sondeo.

Un alt exemplu de farmacogenomică în medicina personalizată este studiul genelor *CYP2C9* și *VKORCl* și al medicamentului warfarină. Warfarina (cunoscută și sub numele de marcă Coumadin) este un medicament anticoagulant prescris pentru a preveni formarea cheagurilor de sânge după intervenții chirurgicale și pentru a ajuta persoanele cu tulburări cardiovasculare predispuse la tromboză . Warfarina inhibă sinteza dependentă de vitamina K a mai multor factori de coagulare. Există o variație de aproximativ un ordin de mărime între pacienți în ceea ce privește dozele de warfarină necesare pentru un răspuns terapeutic. În trecut, medicii au încercat să ajusteze dozele de warfarină printr-un proces de încercare și eroare în primul an de tratament. Dacă doza de warfarină este prea mare, pacientul poate prezenta sângerări severe; dacă doza este prea mică, pacientul poate dezvolta cheaguri de sânge care îi pun viața în pericol. Se estimează că 20% dintre pacienți trebuie spitalizați în primele șase luni de tratament din cauza efectelor secundare ale warfarinei.

Variațiile activității warfarinei sunt afectate de polimorfisme în mai multe gene, în special CYP2C9 *și* VKORCl . Două polimorfisme cu un singur nucleotid în *CYP2C9* duc la un clearance redus al warfarinei și la un risc crescut de sângerare . Prima mutație este o tranziție C - T la codonul 430, rezultând o substituție a aminoacizilor argininei cu cisteină la aminoacidul 144 și o reducere cu 30 % a activității produsului genei *CYP2C9* . A doua mutație are ca rezultat o substituție izoleucină-leucină la codonul 359 și o reducere cu 90% a activității. Aproximativ 25 % dintre persoanele de origine caucaziană sunt heterozigote pentru unul dintre aceste polimorfisme, iar 5% par a fi homozigote. Aproximativ 5% dintre pacienții de origine asiatică sau africană sunt purtători ai acestor variante. Pacienții care sunt heterozigoți sau homozigoți pentru unele alele *CYP2C9* necesită o doză de warfarină cu 10 până la 90 % mai mică . Gena *VKORCl* codifică subunitatea 1 a complexului vitamina K epoxid reductază , o enzimă activatoare a vitaminei K necesară pentru formarea factorilor de coagulare . Activitatea acestei enzime este inhibată de warfarină. O variantă comună a *VKORCl* este o tranziție de la G la A în regiunea promotorului genei, ceea ce duce la niveluri mai scăzute de VKORCl și factori de coagulare . Această mutație determină o sensibilitate crescută la warfarină , ceea ce înseamnă că trebuie utilizate doze mai mici de medicament. Aproximativ 50% dintre indivizii caucazieni sunt heterozigoți pentru această mutație, iar 14% sunt homozigoți. Dintre asiatici, aproximativ 18 % sunt heterozigoți și 80 % sunt homozigoți . Dintre afro-americani, aproximativ 20 % sunt heterozigoți și mai puțin de 1 % sunt homozigoți.

Recent, FDA a recomandat utilizarea testelor genetice CYP2C9 și VKORCI pentru a prezice probabilitatea ca un pacient să aibă o reacție adversă la warfarină . Mai multe companii oferă acum teste pentru detectarea polimorfismelor menționate anterior, utilizând metode bazate pe amplificarea PCR și primeri specifici alelelor . Se estimează că utilizarea testării genetice pentru warfarină ar putea - preveni 17.000 de atacuri de cord și 85.000 de evenimente hemoragice majore pe an. Economiile la costurile asistenței medicale ar putea ajunge la 1,1 miliarde de dolari anual .

Tratamentele și testele farmacogenomice, precum și informațiile genetice pe care se bazează acestea , avansează rapid . Puteți găsi o sursă actualizată de informații despre *toate* aspectele farmacogenomicii în Baza de *cunoștințe* de farmacogenetică . care este descrisă în Caseta 2.

Medicină personalizată și diagnosticul bolilor

În 2009, existau teste genetice pentru aproximativ 2.000 de boli diferite (Figura CE2.6). Aceste teste sunt clasificate în funcție de utilizarea lor și pot aparține uneia sau mai multor dintre următoarele grupuri : testele de diagnostic detectează prezența sau absența variantelor genetice legate de posibile tulburări genetice la un pacient simptomatic; testele predictive detectează o mutație la pacienții cu antecedente familiale ale unei tulburări genetice cunoscute (de exemplu , boala Huntington sau cancerul de sân legat de BRCA) ; testele purtătorilor îi ajută pe medici să identifice pacienții care poartă o mutație genetică legată de o tulburare și care ar putea să o transmită urmașilor lor (de exemplu, boala Tay-Sachs sau fibroza chistică) ; testele prenatale detectează potențiale - tulburări genetice la fetuși (cum ar fi sindromul Down) , iar testarea genetică preimplantatorie se efectuează pe embrioni timpurii pentru a selecta embrioni pentru implantare care nu poartă o posibilă tulburare. Majoritatea testelor genetice detectează prezența mutațiilor cunoscute în gene izolate care sunt legate de o anumită boală (Tabelul CE2.3).

Deși aceste teste genetice sunt extrem de utile pentru detectarea unor boli viitoare și ghidarea tratamentelor, este clar că majoritatea tulburărilor sunt foarte complexe și depind de mai mulți factori. Este posibil ca boli precum diabetul, Alzheimerul și bolile de inimă să fie cauzate de interacțiuni .

CASETA 2 **Baza de cunoștințe de farmacogenomică (PharmGKB): Gene, medicamente** și **boli pe web**

Baza **de cunoștințe** *de farmacogenomică*

PharmGKB **este o bază de date și o resursă de informații disponibile publicului, bazată pe internet, dezvoltată de Universitatea Stanford. Aceasta este finanțată de Institutele** *Naționale de Sănătate* **(NIH) și face parte din Rețeaua de Cercetare Farmacogenomică NIH** , *un* **consorțiu de cercetare din SUA . PharmGKB își propune să ofere cercetătorilor și publicului larg informații pentru a le îmbunătăți înțelegerea modului în care variația genetică contribuie la răspunsul unui individ la medicamente. Site-ul web PharmGKB** *(a se vedea Figura* **CE2.5) permite utilizatorilor să caute gene și peste 650 de variante care afectează răspunsurile la medicamente . De asemenea, oferă - informații despre un număr mare de medicamente, boli și baza lor genetică, căi farmacogenomice , testarea genelor și publicații relevante . Vizitați site -ul web PharmGKB la http://www.pharmgkb.org**

FIGURA CE2.5 Pagina principală a site-ului web PharmGKB.

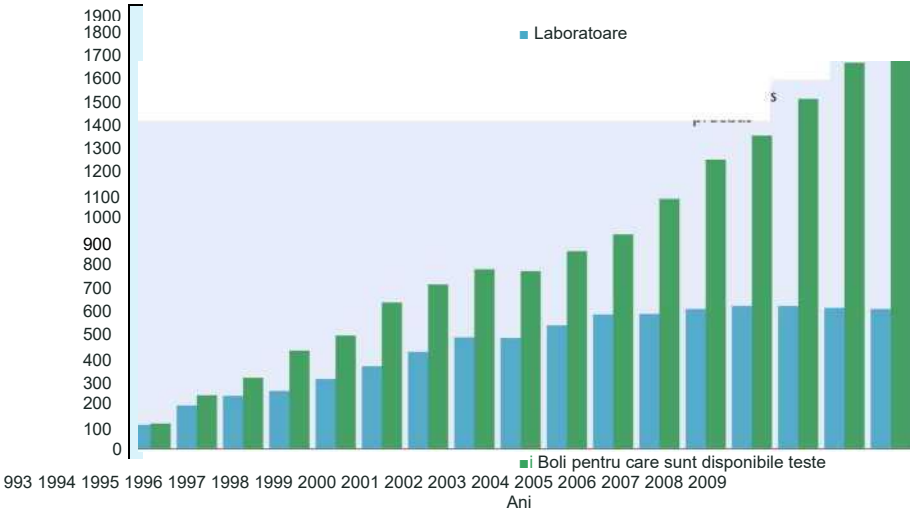


FIGURA CE2.6 Creșterea numărului de teste genetice și laboratoare de testare între 1993 și 2009 în Statele Unite.
Preluat de pe site-ul GeneTests la adresa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/GeneTests/static/whatsnew/labdirgrowth.shtml .

Unele defecte monogenice pentru care sunt disponibile teste genetice

TABELUL CE2.

Boală	Mutația genetică	Descriere
Acondroplazie	Gena FGFR3. 99% dintre pacienți au o mutație punctuală de la G la A la nucleotidul 1138 (substituție G380R)	Creștere osoasă anormală
Cancer ereditar de sân/ovarian	Genele BRCA1 și BRCA2. Ștergeri, duplicații *și* mutații punctuale	Predispoziție la cancer de sân, ovarian, de prostată și alte tipuri de cancer
Distrofia musculară Duchenne	Gena DMD. Mutații punctuale, deleții, inserții, mutații de splicing	Slăbiciune musculară progresivă cu debut precoce, boli de inimă
Sindromul X fragil	Gena FMR1. În principal expansiunea repetițiilor trinucleotidice (CGG) și pierderea funcției	Dizabilitate intelectuală, tulburări de dezvoltare
Ataxia lui Friedrich	Generația FXN. 98% din cazuri prezintă o expansiune a repetiției trinucleotidice (GAA) în intronul 1	Ataxie, slăbiciune musculară, spasticitate, disfuncții cardiace și ale altor organe
Hemofilia A	Generația F8. Mutații punctuale, inserții, deleții, inversiuni	Defecte de coagulare ale factorului VIII, sângerări
Boala Huntington	Generația HTT(HD). Expansiunea repetițiilor trinucleotidice (CAG)	Debutul la vârsta adultă al tulburărilor cognitive și motorii progresive
Sindromul Lesch-Nyhan	Generația HPRT1. Mutații punctuale, deleții, duplicații	Tulburări motorii, cognitive și de dezvoltare
Sindromul Marfan	Gena FBN1. Mutații punctuale, mutații de splicing, deleții	Tulburări ale țesutului conjunctiv care afectează numeroase organe
Boala renală polichistică, dominant	Genele PKD1 și PKD2. Variante de secvență, deleții parțiale sau totale ale unei gene și duplicații	Chisturi în rift, ficat și alte organe organe, anomalii vasculare
Anemia falciformă	Gena HBB . Mutație punctuală care duce la o substituție a lui Glu cu Val în aminoacidul 6	Anemia cu debut precoce

Sursa: GeneReviews la (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book"gene ").

sunt influențate de numeroase gene, dar și de factori precum efectele epigenetice, stilul de viață și mediul înconjurător . Acestea tind să fie cronice și reprezintă o povară semnificativă pentru sistemele de sănătate.

Secvențierea genomului, identificarea polimorfismelor SNP și studiile de asociere genomică (GWAS) încep să dezvăluie unele dintre variantele de ADN care pot crește riscul de a dezvolta boli multifactoriale, cum ar fi cancerul, bolile de inimă și *diabetul* . De exemplu, proiectul Atlasul *Genomului Cancerului* (descris în Capitolul 19) acumulează date echivalente cu 20.000 de proiecte de secvențiere a genomului pe ADN normal și tumoral de la pacienți cu 20 de tipuri diferite de cancer. Astfel de studii dezvăluie că tipurile de cancer clasificate odinioară generic (cum ar fi „cancerul de prostată ”) sunt, de fapt, multe boli diferite atunci când sunt privite prin profilurile lor genetice. De exemplu, în trecut, cancerele hematologice erau clasificate în două grupe principale: leucemii și limfoame. Cu toate acestea, acum știm că fiecare dintre aceste categorii poate fi împărțită în continuare în peste 40 de tipuri distincte, pe baza mutațiilor genetice și a caracteristicilor de expresie. În plus, studiile genomice arată că fiecare tumoră individuală este unică din punct de vedere genetic. Această explozie de informații moleculare începe deja să aibă un impact asupra diagnosticului și tratamentului acestor tipuri de cancer.

Deși progresul în știința genomică este în continuă accelerare, aceste studii abia au început să adune cantitatea incredibilă de date genetice necesare pentru a face predicții precise și a alege tratamente pentru multe boli. Pe măsură ce secvențierea întregului genom devine mai rapidă și mai ieftină, oamenii de știință prevăd că genomica și secvențierea genomului personal vor deveni o parte importantă a diagnosticului și tratamentului personalizat până în 2015.

Dar cum va arăta medicina personalizată, bazată pe genom, în 2015? Și cum vom putea beneficia de pe urma ei? În plus, există probleme etice și sociale pe care va trebui să le abordăm pe măsură ce intrăm în era medicinei personalizate? Următoarele secțiuni tratează exact aceste întrebări.

Analiza genomului personal

În 2010, revista The *Lancet* a publicat un raport care ilustrează tipul de informații pe care le putem obține acum din secvența genomică a unui individ. Pacientul era un bărbat sănătos, în vârstă de 40 de ani, cu antecedente familiale de artrită, anevrism aortic, cardiopatie ischemică și moarte cardiacă subită. Cercetătorii au obținut secvența sa de ADN genomic folosind o metodă rapidă de secvențiere cu o singură moleculă (Caseta 3). Prin compararea secvenței pacientului cu alte secvențe ale genomului uman conținute în baze de date, au fost descoperite 2,6 milioane de polimorfisme SNP și 752 de variații ale numărului de copii. Cercetătorii au analizat apoi datele secvenței genomice pentru a determina care dintre aceste variante ar putea avea un efect asupra fenotipului. Acest lucru s-a realizat prin căutarea polimorfismelor SNP cunoscute în mai multe baze de date mari, crearea manuală a unei baze de date cu polimorfisme SNP asociate bolilor și calcularea ratelor de probabilitate corespunzătoare pentru riscurile asociate cu diverse boli. Analiza a necesitat eforturile combinate a peste două duzini de oameni de știință și medici pe o perioadă de aproximativ un an, precum și utilizarea informațiilor obținute din peste o duzină de baze de date de secvențe, utilizarea de noi instrumente de analiză a secvențelor alături de cele existente și angajarea a sute de articole de cercetare care au trebuit analizate unul câte unul.

Pentru a determina cum ar reacționa acest pacient la produsele farmaceutice, cercetătorii au căutat în baza de date PharmGKB *(vezi* Caseta 2) variante cunoscute ale unor gene importante din punct de vedere farmacogenomic. S-a constatat că pacientul avea 63 de SNP-uri relevante clinic în cadrul genelor asociate cu reacțiile la medicamente. În plus, genomul său conținea 6 SNP-uri necunoscute anterior, care puteau modifica secvențele de aminoacizi din genele de răspuns la medicamente. De exemplu, secvența genomică a relevat că acest pacient era heterozigot pentru o mutație nulă în *gena CYP2C19.* Această mutație l-ar putea face sensibil la diverse medicamente, inclusiv la cele utilizate pentru a trata anumite aspecte ale bolilor cardiovasculare. De asemenea, ar fi mai sensibil decât în mod normal la warfarină, pe baza SNP-urilor găsite în genele sale *VKORCl* și *CYP4F2.* În schimb, secvența pacientului conținea variante genetice asociate cu un răspuns bun la statine; cu toate acestea, alte variante genetice au sugerat că ar putea avea nevoie de doze mai mari decât în mod normal de statine.

[1] Ashley, EA și colab. 2010. Evaluare clinică care încorporează un genom personal . Lancet 375:1525-1535.

Căutarea mutațiilor în genele care afectează direct dezvoltarea tulburărilor a relevat mai multe variante potențial dăunătoare. Pacientul era heterozigot pentru un SNP al genei CFTR *care* ar schimba o glicină într-o arginină la poziția 458. Această mutație ar putea provoca fibroză chistică dacă este transmisă unui fiu sau unei fiice care a moștenit, de asemenea, o *genă* CFTR defectă de la celălalt părinte. Pacientul era, de asemenea, heterozigot pentru o mutație recesivă în gena precursorului proteinei hemocromatozei ereditare *(UFE).* ...care este asociată cu dezvoltarea hemocromatozei, o boală gravă ce duce la acumularea unor cantități toxice de fier. Pacientul era, de asemenea, heterozigot pentru o mutație recesivă în gena familiei 3 a transportorilor de substanțe dizolvate (*SLC3A1)* . Această mutație este legată de cistinurie , o boală ereditară caracterizată prin excreția inadecvată de cisteină și dezvoltarea de pietre la rinichi. Oamenii de știință au descoperit un SNP heterozigot în cadrul genei parafibrominei *(CDC73)* care ar provoca generarea unei proteine terminate prematur . Această genă este o genă supresoare tumorală legată de dezvoltarea hiperparatiroidismului și a tumorilor paratiroidiene. Prezența acestui SNP a crescut riscul ca pacientul să dezvolte aceste tipuri de tumori dacă unele dintre celulele pacientului ar prezenta o mutație de pierdere a heterozigoției în cealaltă copie a genei.

Analizarea secvenței genomice a acestui pacient pentru a prezice dezvoltarea viitoare a bolilor multifactoriale a fost mai complexă. Studiile de asociere la nivelul întregului genom au relevat un număr mare de variante de secvență asociate cu boli complexe ; cu toate acestea, fiecare dintre aceste variante contribuie de obicei doar la susceptibilitatea generală la boală . Deoarece nu toate variantele au fost descoperite și caracterizate, este dificil să se stabilească un scor numeric de risc pentru fiecare boală pe baza - prezenței unuia sau mai multor SNP-uri. De exemplu, cercetătorii au descoperit polimorfisme SNP în trei gene *(TMEM43, DSP* și *MYBPC3)* care pot fi asociate cu moartea subită cardiacă . Cu toate acestea, efectele exacte a două dintre aceste SNP rămân neclare , iar celălalt SNP nu fusese descris anterior . Pacientul avea cinci SNP-uri în gene asociate cu un risc crescut de a dezvolta infarct miocardic acut și două SNP-uri asociate cu un risc scăzut. Printre SNP -urile asociate cu un risc crescut , o variantă a genei precursoare a apolipoproteinei A (LPA) este asociată cu o creștere de cinci ori a concentrației plasmatice de lipoproteină(a) și un risc dublu de cardiopatie ischemică. Având în vedere potențialele efecte simultane ale multor SNP-uri diferite ,

CASETA 3 Cum se secvențiază un genom uman

Secvența genomică personală descrisă în acest capitol a fost primul genom uman secvențiat folosind o metodă cunoscută sub numele de secvențiere cu o singură moleculă (tSMS™). Alte metode, cum ar fi metoda Sanger și metodele de mare randament de a doua generație descrise în Capitolul 21, necesită clonarea sau amplificarea PCR a unui ADN șablon înainte de secvențiere. În schimb, metoda tSMS secvențiază direct catene individuale de ADN cu o procesare minimă. Secvențierea acestui genom a durat aproximativ o săptămână, a fost efectuată folosind un singur aparat și serviciile a trei persoane și a costat 48.000 de dolari. Secvența a fost produsă de Dr. Stephen Quake, profesor la Universitatea Stanford , care a dezvoltat tehnologia și a condus grupul de cercetare.

Aparatul de secvențiere utilizat în acest studiu se numește HeliScope, un instrument disponibil comercial, de dimensiunea unui frigider , care procesează , afișează și analizează datele secvențiale. HeliScope analizează simultan aproximativ 1 miliard de molecule individuale de ADN pe zi , pe măsură ce aceste molecule sunt supuse sintezei de copiere . Urmează un scurt rezumat al metodei tSMS .

1. ADN-ul este extras din proba pacientului , fragmentat în bucăți scurte cu o lungime cuprinsă între 100 și 200 de nucleotide și denaturat pentru a obține catene simple.
2. Cozile Poly-A sunt adăugate la capetele 3' ale fiecărei catene, iar fiecare catenă este marcată cu o moleculă fluorescentă. Acestea sunt catenele șablon pentru sinteza ADN-ului .
3. Lanțurile șablon hibridizează cu miliarde de molecule oligo-T imobilizate pe suprafața unei celule de flux.
4. fiecăreia dintre aceste molecule șablon oligo-T în celula de flux este vizualizată și localizată folosind iluminarea laser a HeliScope și o cameră cu mărire mare .
5. Moleculele markerului fluorescent sunt decupate din matrițe și îndepărtate prin spălare.
6. Nucleotidele marcate fluorescent (A, T, C sau G) sunt adăugate în celula de flux împreună cu o ADN polimerază, cu un nucleotid adăugat per ciclu de reacție . Dacă o catenă șablon conține un nucleotid complementar după secvența primerului oligo-T (de exemplu, o G), atunci un C fluorescent va fi încorporat în timpul ciclului C (Figura CE2.7).
7. După îndepărtarea ADN polimerazei și a excesului de C fluorescent prin spălare , șabloanele care conțin un G în acea poziție vor apărea fluorescente în Heli Scope, permițând stabilirea poziției lor (Figura CE2.8).
8. După obținerea imaginii încorporării G , markerul fluorescent al nucleotidelor G încorporate este tăiat și îndepărtat prin spălare împreună cu ADN polimeraza.
9. În ciclul următor, ADN polimeraza și un alt nucleotid marcat fluorescent (de exemplu, T) sunt adăugate în celula de flux . Nucleotidele T vor fi încorporate în lanțurile de ADN complementare în creștere dacă șablonul conține un nucleotid A în aval de capătul 3' în creștere .
10. Prezența unei proteine T fluorescente va fi detectată și poziționată de HeliScope , iar procesul se repetă suficient de multe cicluri pentru a sintetiza aproximativ 32 de nucleotide de ADN complementar din fiecare șablon.

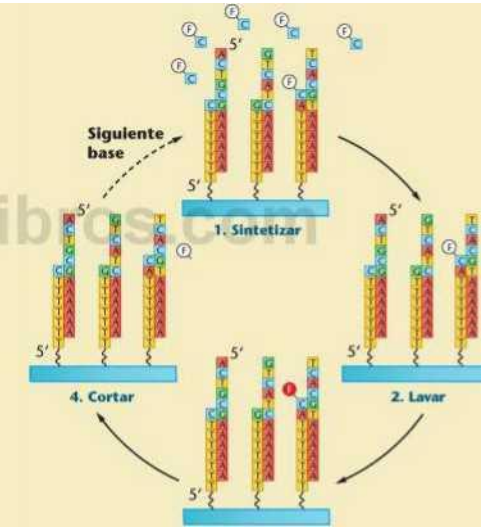
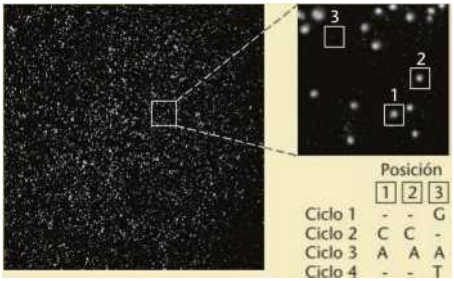


FIGURA CE2.7 Etapele tehnicii de secvențiere cu o singură moleculă reală (tSMS). Moleculele oligo-T, legate de un substrat solid, sunt atașate la fragmente de ADN genomic. Etapa 1: Se adaugă un nucleotid (FC) marcat fluorescent și ADN polimerază . Moleculele FC sunt sintetizate pe moleculele oligo-T dacă în ADN-ul genomic este prezent un reziduu G. Etapele 2 și 3: Excesul de molecule FC și ADN polimerază sunt spălate și se obține o imagine care arată prezența unei molecule oligo-T marcate și locația acelei etichete. Etapa 4: Eticheta fluorescentă (F) este decupată din moleculele FC încorporate. Acești pași sunt repetati cu alte nucleotide marcate fluorescent până când au fost sintetizate aproximativ 32 de nucleotide .

Continúa

CASETA 3 Cum se secvențiază un genom uman *(continuare)*



11. HeliScope determină secvența fiecărei catene șablon pe baza acestor cicluri de sinteză *și* a imaginilor fluorescente. Apoi efectuează - alinierea secvențelor tuturor secvențelor individuale pentru a compila secvența genomică completă.

Metodele și analiza tSMS sunt ilustrate într -un videoclip - disponibil pe site-ul Helicos BioSciences Corporation la următoarea adresă : http://www.hdicosbio.com/Technology/True-SingleMoleculeSequencing/tabid/64/Default.aspx

FIGURA CE2.8 Secvențe de molecule individuale obținute folosind un secvențiator HeliScope. Partea stângă prezintă o vedere mărită a unei celule de flux. Partea dreaptă prezintă o imagine la mărire mai mare a unei porțiuni a celulei de flux , unde sunt prezentate pozițiile moleculelor individuale care au încorporat un nucleotid fluorescent G (FG) în timpul ciclului X al celui mai recent ciclu de sinteză. În acest caz , moleculele 1 și 2 au încorporat un FG, dar molecula 3 nu .

Luând în considerare factorii personali de mediu și stilul de viață al pacientului , cercetătorii au concluzionat că structura genetică a pacientului a contribuit la un risc semnificativ crescut pentru opt tulburări diferite (cum ar fi diabetul de tip 2, obezitatea și cardiopatia ischemică), precum și la un risc redus pentru alte șapte tulburări (cum ar fi boala Alzheimer). Pacientului i-au fost oferite serviciile unor geneticieni clinicieni, consilieri și directori de laboratoare clinice pentru a-l ajuta să interpreteze informațiile obținute din secvențierea genomică. Consilierea genetică a abordat domenii precum implicațiile psihologice și reproductive ale riscurilor de boli genetice, potențialul de discriminare pe baza rezultatelor testelor genetice și incertitudinile inerente în evaluarea riscurilor.

Provocări tehnice, sociale și etice

Există încă multe dificultăți tehnice de depășit înainte ca medicina personalizată să devină o parte standard a îngrijirii medicale. - Tehnologiile de secvențiere și aliniere a genomului, analiza microcipurilor și detectarea SNP-urilor trebuie să fie mai rapide, mai precise și mai ieftine. Oamenii de știință sunt încrezători că aceste provocări pot fi depășite cu succes în următorii ani; cu toate acestea, analiza personalizată a genomului trebuie utilizată cu prudență până când tehnologia va fi extrem de precisă și fiabilă. Chiar și o rată mică de eroare în secvențele genetice sau în rezultatele testelor ar putea duce la diagnostice greșite și tratamente necorespunzătoare. Poate că o provocare și mai mare este capacitatea oamenilor de știință de a stoca și interpreta cantitățile enorme de date secvențiale generate . Fiecare genom individual produce echivalentul a 200 de directoare telefonice mari, care trebuie stocate în baze de date, analizate pentru variante de secvență relevante și fiecare SNP interpretat. Pentru a efectua aceste tipuri de analize, oamenii de știință trebuie să utilizeze rezultatele studiilor de genotipare a populației la scară largă, care le permit să lege variantele de secvență de fenotipuri, boli sau răspunsuri la medicamente. Experții sugerează că astfel de studii vor necesita eforturi coordonate ale echipelor de cercetare publice și private și vor dura mai mult de un deceniu pentru a fi finalizate. Oamenii de știință vor trebui, de asemenea, să dezvolte algoritmi eficienți și sisteme automatizate pentru a gestiona această cantitate enormă de informații . În plus, aceste analize de date trebuie să țină cont de faptul că variantele genetice contribuie doar parțial la genotipurile individuale. Medicina personalizată va trebui, de asemenea, să integreze informații despre factorii de mediu, epigenetici și ai stilului de viață.

O altă provocare tehnică cu care va trebui să se confrunte medicina personalizată este dezvoltarea tehnologiilor automatizate pentru

Informații medicale. Companiile și organizațiile din sectorul sănătății vor trebui să utilizeze dosare medicale electronice pentru a stoca, extrage și analiza profilul genomic al fiecărui pacient, precum și pentru a compara aceste informații cu cunoștințele noastre în continuă dezvoltare despre gene și boli. În prezent, mai puțin de 10% dintre spitale și medici din Statele Unite au acces la aceste tipuri de tehnologii informaționale.

Medicina personalizată are și mai multe implicații sociale. Pentru ca medicina personalizată să fie disponibilă tuturor, costurile testelor genetice, precum și procesul de consiliere genetică aferent, trebuie rambursate de către companiile de asigurări, chiar și în cazurile în care nu există afecțiuni sau simptome preexistente. Sunt necesare modificări legislative pentru a se asigura că testele genetice și secvențierea genomică sunt corecte și că datele generate sunt stocate în mod fiabil în baze de date care garantează confidențialitatea pacientului. În prezent, mai puțin de 1 % din testele genetice sunt reglementate de agenții precum FDA.

Medicina personalizată necesită, de asemenea, schimbări în sistemul de educație medicală. În viitor, medicii vor fi așteptați să utilizeze informațiile genomice ca parte a procesului de tratare a pacienților lor. Pentru ca acest lucru să fie posibil, facultățile de medicină vor trebui să instruiască viitorii medici pentru a putea interpreta și explica datele genetice. În plus, va fi nevoie de mai mulți consilieri genetici și specialiști în genomică. Acești specialiști vor trebui să înțeleagă relația dintre genomică și boli, precum și să fie capabili să manipuleze date bioinformatice. În 2010, în America de Nord existau doar aproximativ 2.500 de consilieri genetici și 1.100 de geneticieni clinicieni.

Aspectele etice ale noii medicine personalizate sunt , de asemenea , multiple și problematice. De exemplu, se susține uneori că costul necesar pentru dezvoltarea genomicii și a medicinei personalizate reprezintă o alocare greșită a unor resurse deja limitate . Unii susțin că știința ar trebui să se concentreze pe rezolvarea altor probleme mai ample cu care se confruntă omenirea , cum ar fi distribuția alimentelor și a apei curate , înainte de a se lansa în proiecte precum medicina personalizată. În mod similar, alți critici susțin că o astfel de îngrijire medicală extrem de specializată și costisitoare nu va fi disponibilă tuturor și va exacerba inegalitățile economice . Există , de asemenea, îngrijorări cu privire la modul în care vom proteja confidențialitatea informațiilor genomice - conținute în bazele de date și în dosarele medicale private . În plus, sunt necesare modalități eficiente de a preveni discriminarea pe piața muncii sau în acoperirea asigurărilor pe baza informațiilor obținute din analizele genomice .

Majoritatea experților sunt de acord că ne aflăm la începutul - unei revoluții a medicinei personalizate. Informațiile obținute din cercetarea genetică și genomică sporesc deja eficacitatea medicamentelor și permit profesioniștilor din domeniul sănătății să prezică bolile înainte ca acestea să se manifeste. În viitor , medicina personalizată va afecta aproape fiecare aspect al îngrijirii medicale . Abordând provocările reprezentate de această nouă medicină personalizată, ne putem asigura că aceasta este utilizată pentru a oferi cel mai mare beneficiu unui număr cât mai mare de oameni .

Lecturi și resurse selectate

Articole din reviste

Burdge, GC și Illicrop, KA 2010. Nutriție, epigenetică și dezvoltare. Ashley, EA și colab. 2010. Evaluare clinică care încorporează un genom personal. *Lancet* 375: 1525-1535.

Collins, F. 2010. A sosit revoluția ? *Nature* 464: 674-675.

Hamburg, MA și Collins, FS 2010. Calea către ***medicina*** personalizată . *New England Journal* of *Medicine* 363:301-304.

Manolio, TA și colab. 2009. Descoperirea ereditabilității lipsă a bolilor complexe. *Nature* 461: 747-753.

Ormond, KE și colab. 2010. Provocări în aplicarea clinică a secvențierii întregului genom. *Lancet* 375: 1749-1751.

Pushkarev, D.» și colab. 2009. Secvențierea cu o singură moleculă a unui genom uman individual . Nature *Biotech* 27: 847-850.

Ross, JS 2009. Receptorul HER-2 și cancerul de sân: zece ani de terapie anti-HER-2 țintită și medicină personalizată. *The Oncologist* 14:320-368.

Venter, JC 2010. Mai multe genomuri personale așteaptă. *Nature* 464: *ffib-bTi.*

Weinshilboum, R. și Wang, L. 2004. Farmacogenomică: De la laborator la patul pacientului. *Nature Rev Drug Disc* 3: 739-748.

Site-uri web

pentru Medicină Personalizată , 2009. Argumente pentru Medicina Personalizată, http://www.personalizedmedicinecoalition.org/sites/default/files/TheCaseforPersonalizedMedicine_5_5_09.pdf

Universitatea din Washington, 2010. Site - ul web GeneTests: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/?db=GeneTests

Informații despre Proiectul Genomului Uman al Programului Genomului Departamentului de Energie al SUA, 2008. Farmacogenomică. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/pharma.shtml

pentru Alimente și Medicamente din SUA, 2010. Tabelul biomarkerilor genomici valizi în contextul etichetelor medicamentelor aprobate , http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm

CAPITULOS ESPECIALES SOBRE GENÉTICA MODERNA

CAPITOLUL SPECIAL 3

Epigenética

Noul domeniu emergent al epigeneticii ne oferă baza pentru înțelegerea modului în care anumite modificări ereditare, altele decât cele determinate de secvența ADN-ului, pot influența variația fenotipică.

Celulele somatice ale corpului uman conțin între 20.000 și 25.000 de gene. Cu toate acestea , în oricare dintre aceste celule, doar un procent relativ mic din totalul genelor este activ. În cele peste 200 de tipuri diferite de celule prezente în organism, se transcriu seturi distincte de gene specifice fiecărei celule , în timp ce restul genomului este inactiv transcripțional . În plus , programele de expresie genică devin din ce în ce mai restrictive în timpul dezvoltării și diferențierii , pe măsură ce celulele embrionare devin treptat celule adulte specializate cu fenotipuri diferențiate. Opinia predominantă a fost că reglarea expresiei genice este coordonată de promotori, promotori proximali, amplificatori și alte elemente de reglare care acționează în cis , precum și de proteinele care leagă ADN-ul și factorii de transcripție . Această reglare poate avea loc în orice etapă a expresiei genice . De exemplu, fazele reglării transcripționale , precum și procesarea ARNm și alte etape ale reglării post - transcripționale, controlează cantitatea de produs genetic sintetizat dintr - un șablon ADN . Totuși , pe măsură ce aflăm mai multe despre organizarea genomului și reglarea expresiei genelor, devine clar că mecanismele genetice clasice nu pot explica modul în care apar anumite fenotipuri . De exemplu, gemenii monozigoți au genotipuri identice , dar nu sunt întotdeauna identici din punct de vedere fenotipic . Deși pentru fiecare genă, o alelă este moștenită de la mamă , iar cealaltă de la tată, în unele cazuri este exprimată doar alela maternă sau paternă , în timp ce cealaltă este silențioasă din punct de vedere transcripțional.

Domeniul emergent al epigeneticii ne oferă fundamentul pentru a înțelege cum anumite modificări moștenite , distincte de cele determinate de secvența ADN , pot influența variația fenotipică . Aceste progrese extind considerabil cunoștințele noastre despre bazele moleculare ale reglării genelor și au aplicații într- o gamă largă de domenii, inclusiv boli genetice , cancer și comportament .

O trăsătură epigenetică este un fenotip stabil, ereditar mitotic și meiotic , care rezultă din modificări ale

Expresia genelor are loc fără modificări ale secvenței ADN-ului. Epigenetica este studiul modului în care aceste modificări modifică modelele de expresie genică specifice fiecărei celule și țesut . 1.a Reglarea epigenetică a expresiei genelor utilizează modificări reversibile ale structurii ADN-ului și cromatinei pentru a media interacțiunea genomului cu o varietate de factori de mediu și pentru a genera modificări ale modelelor de expresie genică ca răspuns la acești factori . Epigenomul este termenul folosit pentru a desemna starea epigeotică a unei celule. Pe parcursul vieții sale, un organism are un singur genom, dar acest genom poate fi modificat în diferite tipuri de celule în momente diferite pentru a produce multe epigenomi.

Eforturile actuale de cercetare se concentrează pe diverse aspecte ale epigeneticii: cum apare un epigenom în timpul dezvoltării și diferențierii celulare , ce mecanisme mențin aceste stări și cum sunt transmise prin mitoză și meioză , devenind trăsături ereditare . În plus, deoarece anumite modificări ale genomului controlate epigenetic sunt asociate cu cancerul și unele boli comune, cum ar fi diabetul și astmul , eforturile de cercetare sunt îndreptate și către dezvoltarea de medicamente care pot modifica sau inversa modificările epigenetice asociate bolilor în celule.

Au fost descoperite mai multe sisteme și căi care dau naștere la stabilirea, menținerea și moștenirea stărilor epigenetice. Aceste căi sunt organizate în trei categorii, deși, fără îndoială, alte mecanisme și categorii rămân de elucidat . Prima categorie include semnale de mediu numite *generatoare epigenetice* , pe care celula le primește și care stimulează un răspuns printr -o cale intracelulară . Răspunsurile la aceste semnale generatoare se numesc *inițiatori epigenetici.* Componentele acestei a doua categorii produc modificări epigenetice. Acești inițiatori includ căi de transducție a semnalului proteină- proteină , proteine care leagă ADN-ul și ARN necodificator . Acțiunile inițiatorilor definesc locația în care au loc modificările epigenetice în cromatină . Recunoașterea secvenței de ADN este o parte necesară a acestui răspuns. Odată ce au avut loc modificările epigenetice, acestea sunt menținute de elemente moleculare numite *menținători epigenetici.* Componentele acestei a treia categorii conservă și mențin modificările epigenetice în generațiile actuale și viitoare . Acești menținători nu sunt specifici secvenței, operează oriunde în genom și depind de inițiatori pentru a specifica locurile în care vor avea loc modificările cromatinei . În plus , agenții de menținere asigură că modificările epigenetice sunt transmise prin mitoză la celulele fiice sau prin meioză la gameți și generațiile ulterioare. Aceștia includ metilarea ADN-ului și modificările histonei. Figura CE3.1 prezintă aceste componente ale căii epigenetice, împreună cu câteva exemple. Trebuie menționat că modificările histonei fac parte din procesul general de activare transcripțională; aceasta înseamnă că unele, dar nu toate, modificările histonei sunt evenimente epigenetice.

Modificarea epigenetică a genomului oferă un răspuns clar și definit la semnalele de mediu, mediând modificări ale expresiei genelor care persistă de-a lungul generațiilor. S-a demonstrat că epigenetica influențează multe aspecte ale biologiei, inclusiv restricționarea progresivă a expresiei genelor în timpul dezvoltării, expresia specifică alelelor tipică amprentei genetice și interacțiunile mediu-genă în timpul dezvoltării prenatale care afectează fenotipurile adulte. Reglarea anormală a epigenomului duce la tulburări genetice umane, cum ar fi sindromul Prader-Willi, sindromul Angelman și sindromul Beckwith-Wiedemann. Pierderea sau alterarea altor stări epigenetice poate duce la cancer.

Cunoașterea mecanismelor modificărilor epigenetice ale genomului, a modului în care aceste modificări sunt menținute și transmise și a relațiilor lor cu procesele biologice de bază sunt importante pentru înțelegerea dezvoltării, a proceselor de boli, a reproducerii și a evoluției adaptării la mediu.

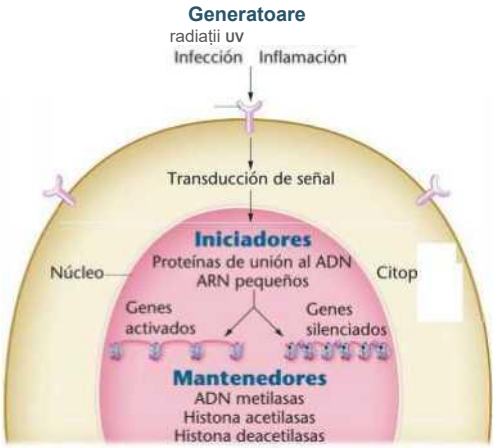


FIGURA CE3.1 Un proces epigenetic implică recepționarea și procesarea semnalelor senzoriale care au ca rezultat modificări ce modifică și mențin tiparele de expresie genică.

Aici ne vom concentra asupra modului în care modificările epigenetice afectează anumite boli genetice, cancerul și interacțiunile mediu-genom. Întrucât modificările epigenetice sunt potențial reversibile, vom examina și modul în care cunoștințele despre mecanismele moleculare ale epigeneticii sunt utilizate pentru a dezvolta medicamente și tratamente pentru bolile umane.

Modificări epigenetice ale genomului

Spre deosebire de genom, care este identic în toate tipurile de celule ale unui organism, epigenomul este specific tipului de celulă și ereditar. La fel ca genomul, epigenomul poate fi transmis celulelor fiice prin mitoză și generațiilor viitoare prin meioză. Spre deosebire de mutațiile genomice, modificările epigenetice sunt reversibile, deschizând posibilitatea dezvoltării de medicamente pentru tratarea afecțiunilor legate de disfuncțiile proceselor epigenetice. În secțiunile următoare, vom examina mecanismele epigeneticii și rolul acesteia în imprimare genetică, cancer și interacțiunile genom-mediu, oferind astfel o imagine de ansamblu asupra numeroaselor funcții îndeplinite de acest mecanism nou descoperit de reglare a genelor.

Există trei mecanisme epigenetice principale: (1) modificarea reversibilă a ADN-ului prin adăugarea sau eliminarea grupărilor metil; (2) modificarea histonelor prin adăugarea sau eliminarea grupărilor chimice; și (3) reglarea expresiei genelor de către molecule mici de ARN necodificatoare.

Metilarea

La mamifere, metilarea ADN-ului are loc după replicare și implică adăugarea unei grupări metil (—CH_2) la citozină, o reacție catalizată de enzimele metiltransferază. Metilarea ADN-ului are loc și în timpul diferențierii celulelor adulte. În ambele cazuri, metilarea are loc aproape exclusiv pe baze citozinice adiacente unei guanine, o combinație numită dinucleotidă CpG. Multe dintre aceste dinucleotide se grupează în regiuni numite insule CpG, situate în interiorul și în apropierea secvențelor promotoare adiacente genelor (Figura CE3.2). Insulele adiacente genelor esențiale (gene constitutive) și genelor specifice celulei nu sunt mediate, lăsând aceste gene disponibile pentru transcripție. Alte gene cu insule CpG metilate adiacente sunt reduse la tăcere transcripțional . Grupările metil ale insulelor CpG ocupă șanțul major al ADN-ului și blochează legarea factorilor de transcripție necesari pentru a forma complexe de transcripție.

Majoritatea dinucleotidelor CpG metilate nu sunt adiacente genelor , ci se găsesc în secvențe repetitive de ADN situate în regiuni heterocromatice ale genomului, inclusiv centromerul. Metilarea acestor secvențe contribuie la reducerea la tăcere a transcripției.

RECUADRO 1

El principio de la epigenética

CH. Waddington acuñó el término epigenética en la década de 1940, para describir cómo la influencia de los factores ambientales sobre los sucesos del desarrollo puede afectar al fenotipo del adulto. Demostró que las alteraciones medioambientales durante el desarrollo inducen fenotipos alternativos en organismos con genotipos idénticos. Utilizando *Drosophila melanogaster,* Waddington determinó que los patrones de las venas de las alas pueden alterarse administrando descargas de calor durante el desarrollo pupal. Los adultos con estos cambios inducidos ambientalmente se utilizaron para establecer cepas que presentaban el fenotipo alternativo sin necesidad de un estímulo ambiental continuado. Denominó a este fenómeno «asimilación genética*. En otras palabras, las interacciones entre el ambiente y el genoma durante ciertas etapas del desarrollo producen efectos fenotípicos que son hereditarios.

En la década de 1970, Holliday y Pugh propusieron que los cambios en los programas de expresión génica durante el desarrollo pueden depender de la metilación de bases específicas del ADN y que la alteración de estos patrones de metilación puede afectar al fenotipo resultante. Además, la restricción progresiva de las rutas de desarrollo durante la diferenciación puede explicarse por un programa de metilación que silencia dotaciones de genes en estadios concretos de la embriogé- nesis. Diversos factores, entre los que se incluyen el trabajo de Waddington, el modelo de metilación de Holliday y Pugh y el descubrimiento de que es necesaria la expresión de los genes tanto del genoma materno como del paterno para un desarrollo normal, han ayudado a preparar el terreno para el nacimiento de la epigenética y la epige- nómica como campos de investigación científica.

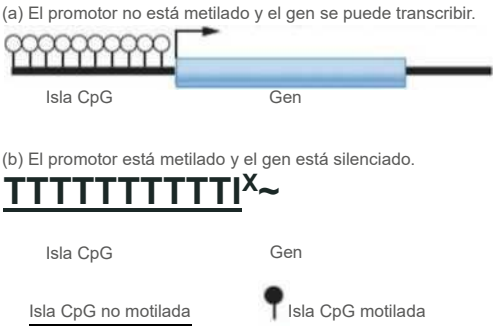

(a) El promotor no está metilado y el gen se puede transcribir.
Isla CpG
Gen
(b) El promotor está metilado y el gen está silenciado.
TTTTTTTTTTI
Isla CpG
Gen
Isla CpG no motilada
Isla CpG motilada

FIGURA CE3.2 las islas CpG suelen localizarse corriente arriba de las regiones promotoras.

y la replication de elementos transponibles tales como las secuencias LINE y SINE *(véase* el Capítulo 12), que constituyen una fracción muy importante del genoma humano. La metilación heterocromática también mantiene la estabilidad del cromosoma, impidiendo la translocación y otras anormalidades cromosómicas.

Como parte de la compensación de dosis génica, los cromosomas X de las hembras de mamífero se inactivan, convirtiéndose en heterocromatina. Estos cromosomas inactivados tienen patrones alterados de metilación del ADN (consulte el Capítulo 7 para ver una explicación detallada sobre la inactivación del cromosoma X). Como hemos mencionado anteriormente, la metilación CpG en las regiones eucromáticas da lugar a un patrón de transcripción génica especifico del progenitor.

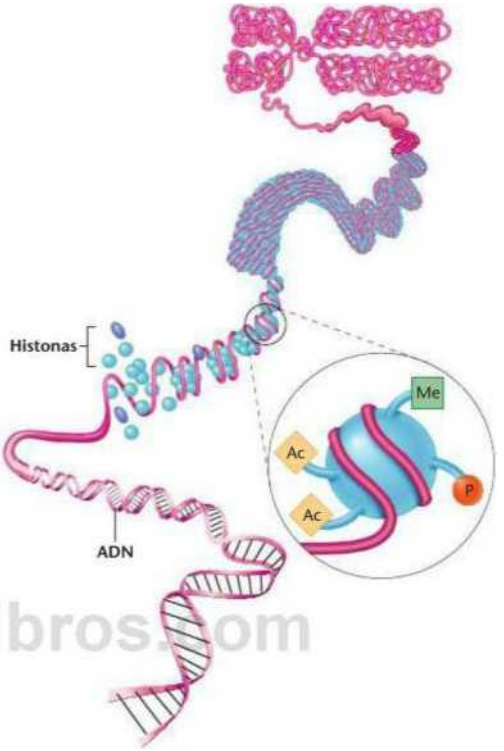


FIGURA CE3.3 Los nucleosomas, que son agrupaciones de histonas, son el foco de las modificaciones epigenéticas. Ac — grupos acetilo, Me — grupos metilo, P — grupos fosfato.

Modificarea histonei

Pe lângă metilarea ADN-ului , modificarea histonei este un mecanism epigenetic important de reglare a genelor. Reamintim că cromatina este compusă din ADN înfășurat în jurul unui octamer de proteine histonice pentru a forma nucleozomi. Aminoacizii din regiunea N - terminală a acestor histone pot fi modificați covalent în mai multe moduri, inclusiv prin acetilare, metilare și fosforilare (Figura CE3.3). Aceste modificări apar la secvențele de aminoacizi conservate din cozile regiunii N -terminale a histonelor , care ies din nucleozom. Modificarea chimică a histonelor modifică structura cromatinei, făcând genele accesibile sau inaccesibile pentru transcripție . În mod normal, atunci când histonele sunt modificate prin acetilare, o reacție catalizată de enzima histon acetiltransferază (HAT), structura cromatinei este „ deschisă”, făcând genele din acești nucleozomi modificați disponibile pentru transcripție [Figura CE3.4(a)]. Această modificare este reversibilă, iar grupările acetil pot fi îndepărtate de o altă enzimă, histon deacetilaza (HDAC), schimbând modificarea cromatinei în „închisă” și reducând la tăcere genele, făcându-le inaccesibile pentru transcripție [Figura CE3.4 (b)]. Cu toate acestea, programul de modificare a histonei depinde de alți factori, cum ar fi prezența sau absența grupărilor metil pe histone.

Programul de modificare a aminoacizilor este complex și, adesea , același tip de modificare poate avea rezultate transcripționale opuse. De exemplu, metilarea lizinei 4 sau 27 a histonei H3 duce la activarea transcripției, în timp ce metilarea lizinei 9 duce la reducerea la tăcere a transcripției. S- a constatat că anumite combinații de modificări ale histonei controlează starea transcripțională a unei regiuni .

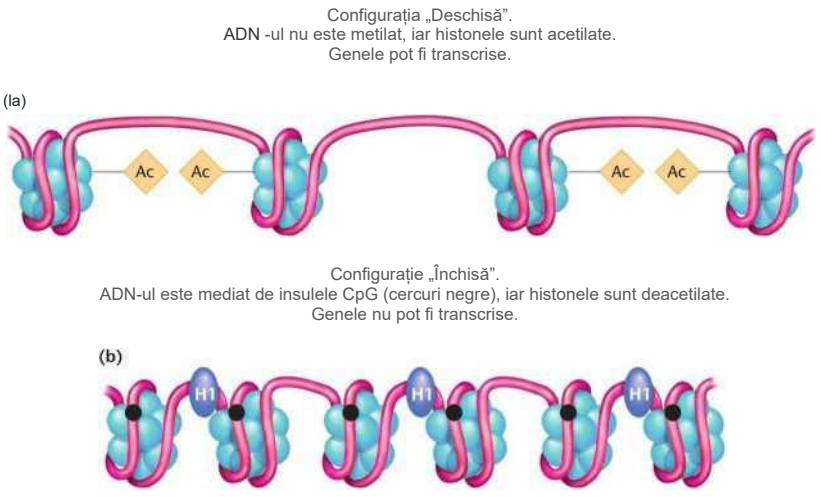


FIGURA CE3.4 Modificări epigenetice ale genomului.

al cromatinei. De exemplu, dacă lizina 9 a histonei H3 este mediată sau nu este controlată de modificări efectuate în altă parte a acestei proteine. Pe de o parte, dacă serina 10 este fosforilată, metilarea lizinei 9 este inhibată. În schimb , dacă uzina 14 este deacetilată, metilarea uzinei 9 este facilitată. Suma modelelor complexe și a interacțiunilor modificărilor histonei care modifică organizarea cromatinei și expresia genelor este cunoscută sub numele de cod histonei. Detaliile despre cum funcționează acest nivel de reglare încep să apară, dar nu sunt încă pe deplin înțelese.

Interferența ARN

Pe lângă metilarea ADN-ului și modificarea histonei, moleculele mici de ARN necodificatoare (discutate în Capitolul 17) participă, de asemenea, la reglarea epigenetică a expresiei genelor. După transcripție, aceste molecule de siARN (ARN interferent mic) se asociază cu complexe proteice pentru a forma complexe de silențiere *induse de ARN (RISC).* RISC-urile se leagă de molecule de ARNm care poartă secvențe complementare cu siARN-ul conținut în RISC. Dacă siARN-urile nu sunt perfect complementare cu ARNm-urile, legarea interferează cu translația, ducând la reglarea negativă a expresiei genelor. Cu toate acestea, dacă siARN-urile din complexul RISC *sunt* perfect complementare cu secvențele de ARNm, ARNm -ul este scindat și distrus, reducând efectiv la tăcere gena.

Recent s-a descoperit că siARN-urile pot reduce la tăcere genele prin interferența directă cu inițierea transcripției. Aceasta nu implică nicio modificare a modificărilor epigenetice existente ale promotorului și nici nu necesită modificări noi. În schimb, siARN-urile complementare regiunilor promotorului se leagă de un promotor. Această legare blochează asamblarea complexului de pre-inițiere, împiedicând legarea factorului de transcripție TFIIB și a ARN polimerazei.

Moleculele de ARNsi se pot asocia, de asemenea, cu complexe proteice pentru a forma complexe de silențiere *transcripțională induse de ARN* (RITS *).* Complexele RITS inițiază formarea heterocromatinei facultative , care reduce la tăcere genele situate în aceste regiuni heterocromatice nou create. Spre deosebire de heterocromatina telomerilor și centromerilor, care este constitutivă, starea heterocromatică a heterocromatinei facultative este reversibilă și se poate converti în eucromatină, făcând genele din această regiune din nou accesibile pentru transcripție.

În concluzie, modificările epigenetice alterează structura cromatinei , fără a schimba secvența ADN-ului , prin diverse mecanisme, inclusiv metilarea ADN-ului, acetilarea histonei și interferența ARN . Aceste modificări epigenetice creează un epigenom care, la rândul său, poate regla dezvoltarea normală sau poate genera răspunsuri la indicii de mediu.

Epigenetică și amprentare

Mamiferele moștenesc o copie maternă și una paternă a fiecărei gene autozomale, iar una sau ambele copii ale acestor gene pot fi exprimate la urmași. Genele imprimate exprimă doar alela maternă sau paternă. Acest model de expresie alelică specific părintelui se stabilește în timpul formării gameților. Metilarea diferențială a regiunilor bogate în CpG are ca rezultat imprimarea specifică alelelor și reducerea ulterioară la tăcere a genelor.

La șoareci, se credea că mai puțin de 100 de gene sunt supuse imprintării genetice, dar studii recente au identificat peste 1.300 de gene care o fac. La oameni, se consideră că peste 150 de gene sunt candidate pentru imprintare, dar descoperirile la șoareci sugerează că mult mai multe gene imprintate rămân de identificat la oameni.

Odată ce o genă a fost mediată și imprimată, aceasta este redusă la tăcere transcripțional în timpul embriogenezei și dezvoltării. Majoritatea genelor imprimate direcționează aspecte ale creșterii în timpul dezvoltării prenatale. De exemplu, la șoareci, genele de pe cromozomul X matern sunt exprimate în placentă, în timp ce genele de pe cromozomul X patern sunt reduse la tăcere. La nivelul genelor individuale , existența unei singure alele funcționale face ca aceste gene să fie extrem de susceptibile la efectele dăunătoare ale mutațiilor. Deoarece genele imprimate sunt grupate, o mutație într-o genă poate afecta funcția genelor imprimate adiacente, amplificând impactul acesteia asupra fenotipului . Mutațiile din genele imprimate pot apărea din modificări ale secvenței ADN sau din modificări epigenetice, numite epimutații; ambele sunt - modificări ereditare ale activității genelor.

Modelul de imprimare genetică la mamifere este reprogramat în fiecare generație. De exemplu, femelele primesc un set de cromozomi de la mamă și un altul de la tată. În celulele somatice și germinale, setul de cromozomi materni are amprente feminine, iar setul patern conține amprente masculine. Când formarea gameților începe în celulele germinale feminine, amprentele de pe ambele seturi de cromozomi sunt șterse și reprogramate prin modificarea modelului de metilare pentru a genera un model imprimat feminin care este transmis generației următoare prin intermediul ovulului (Figura CE3.5). În mod similar, în celulele germinale masculine, amprentele de pe seturile de cromozomi materni și paterni sunt șterse și reprogramate prin metilare pentru a deveni un set imprimat masculin. Această reprogramare are loc în două faze: în celulele germinale ale părintelui și în embrionul în curs de dezvoltare , chiar înainte de implantare. În prima fază,

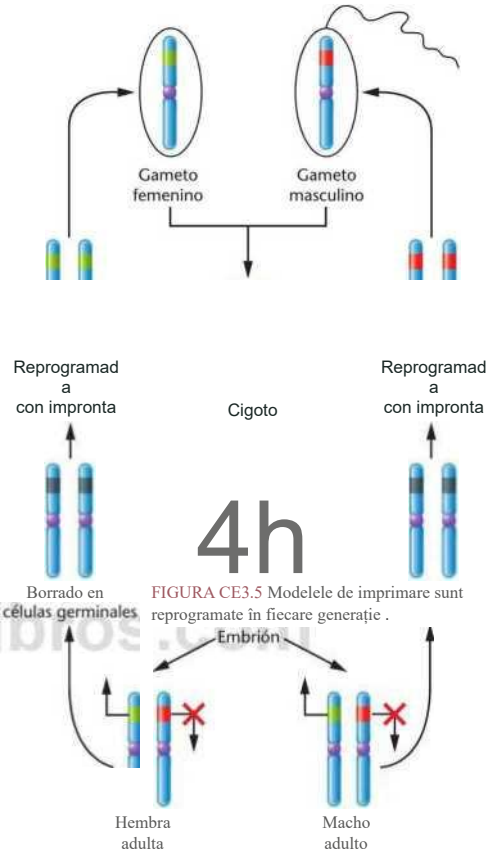


FIGURA CE3.5 Modelele de imprimare sunt reprogramate în fiecare generație .

Ștergerea prin demetilare și reprogramarea prin remetilare stabilesc un model de imprimare specific părintelui în celulele germinale ale părintelui. În a doua fază, demetilarea la scară largă are loc în embrion cu puțin timp înainte de stadiul de dezvoltare cu 16 celule. După implantare, remetilarea genomică diferențială recalibrează acele alele materne și paterne care vor fi inactivate. Este important de reținut că, odată imprimate, alelele rămân inactive în toate celulele,

Ștergerea celulelor germinale

Genă activă

în timp ce genele reduse la tăcere prin metilarea epigenetică pot fi reactivate prin semnale externe în timpul sau după diferențiere.

Majoritatea bolilor umane asociate cu imprimarea genetică (imprinting) își au originea în timpul creșterii și dezvoltării fetale. Defectele de imprimare genetică cauzează sindromul Prader-Willi, sindromul Angelman, sindromul Beckwith-Wiedemann și alte tulburări (Tabelul CE3.1). Cu toate acestea, având în vedere numărul de gene candidate și posibilitatea descoperirii de gene imprimate suplimentare, numărul total de boli genetice imprimate ar putea fi mult mai mare.

Unele tulburări de imprimare la ființele umane

Boală	Locus
Osteodistrofie ereditară Albright, sindromul	20q13
Angelman	1 5q11-q15
Sindromul Beckwith-Wiedemann	23:15
Sindromul Prader-Willi	1 5q11-q15
Sindromul Silver-Russell	Cromozomul 7
Disomie uniparentală 14	Cromozomul 14

La om, majoritatea genelor imprimate cunoscute codifică factori de creștere sau alte gene care reglează creșterea . În general , alelele genelor imprimate exprimate matern suprimă creșterea , în timp ce alelele paterne amplifică creșterea . O tulburare de imprimare autosomal dominantă , sindromul Beckwith -Wiedemann (BWS), oferă informații despre modul în care nepotrivirile exprimate epigenetic în genele imprimate duc la un fenotip anormal. BWS este o tulburare de creștere excesivă prenatală cu defecte ale peretelui abdominal, organe mărite, greutate excesivă la naștere și predispoziție la cancer. BWS nu este cauzat de o mutație și nici nu este asociat cu vreo aberație cromozomială ; mai degrabă , este o tulburare de imprimare cauzată de prezența unor modele anormale de metilare .

Genele asociate cu BWS sunt situate într-un grup de gene imprimate pe brațul scurt al cromozomului 11. Acest grup conține peste o duzină de gene imprimate, unele exprimate patern și altele matern, toate reglezând creșterea în timpul dezvoltării prenatale. Regiunea imprimată este subdivizată în două domenii reglate separat , dintre care unul conține genele strâns legate *IGF2 (* factorul de creștere asemănător insulinei 2) și *H19. În mod normal, alela paternă* a *IGF2* este exprimată , iar alela omoloagă maternă este imprimată și redusă la tăcere. În cazul H19 , Situația este de obicei inversă : alela maternă este exprimată, iar alela paternă este imprimată și redusă la tăcere. Proteina codificată de *IGF2 este un* factor de creștere , iar produsul genei H19 este un ARN lung , necodificator , care este un represor de creștere . Expresia acestor gene este de obicei controlată de o regiune de control al imprimării (ICR) situată în domeniul lor cromozomial .

Amprentarea maternă anormală într-unul sau ambele domenii poate duce la dezvoltarea sindromului Beckwith -Wiedemann, dar multe persoane afectate prezintă o pierdere a amprentării alelei materne IGF2 . Acest lucru face ca atât alelele materne, cât și *cele* paterne să fie active transcripțional , ceea ce duce la creșterea excesivă a țesuturilor caracteristică acestei boli.

Numărul de gene imprimate cunoscute reprezintă doar o mică parte din genom, dar acestea joacă roluri importante în controlul - creșterii în timpul dezvoltării embrionare și prenatale. Deoarece acționează într- un stadiu atât de timpuriu al dezvoltării , factorii interni sau externi care perturbă modelul epigenetic al imprimării sau expresia genelor imprimate pot avea consecințe fenotipice grave .

În urma introducerii fertilizării *in vitro* (FIV) și a clonării embrionilor în producția de animale de fermă , s -a observat o incidență ridicată a malformațiilor congenitale și a deceselor nou-născuților . Unele studii au arătat că multe dintre aceste probleme au fost legate de modificări epigenetice anormale în timpul creșterii și dezvoltării embrionare . Aceste descoperiri la animale au sugerat posibilitatea ca utilizarea FIV și a altor tehnologii de reproducere asistată (ART) la oameni să poată duce la probleme cu genele imprimate .

Mai multe studii au arătat că copiii născuți prin fertilizare *in vitro* Aceștia prezintă riscul de a se naște cu greutate mică sau foarte mică la naștere , o afecțiune care poate fi cauzată de o imprimare genetică anormală . Utilizarea FIV și a altor tehnologii de reproducere asistată a fost, de asemenea, asociată cu un risc crescut de trei până la șase ori de sindrom Beckwith - Wiedemann (SBW). Un astfel de studiu a examinat epigenomul copiilor cu SBW concepuți printr- o procedură numită injecție intracitoplasmatică de spermatozoizi (ICSI), în care sperma este injectată direct în ovocit . Rezultatele au arătat că majoritatea acestor copii au prezentat modificări specifice atât în modelele de metilare imprimată , cât și în caracteristicile epigenetice . Alte studii au demonstrat că peste 90 % dintre copiii născuți cu SBW după ART au defecte de imprimare genetică . Deoarece tulburările de imprimare genetică nu sunt frecvente (SBW apare cu o frecvență de aproximativ 1 la 15.000 de nașteri), vor fi necesare studii longitudinale la scară largă pentru a stabili o relație cauzală între anomaliile de imprimare genetică , tulburările de creștere și procedurile de reproducere asistată .

Epigenetică și cancer

Studiile epidemiologice investighează rolul factorilor de mediu în variația fenotipică normală și, de asemenea, ca factori de risc în dezvoltarea bolilor. În multe cazuri, este dificil să se obțină măsuri cantitative ale efectelor influențelor multidimensionale ale mediului asupra unui organism. În cazul unor boli complexe, există legături puternice cu factorii de mediu , cum ar fi asocierea dintre tutun și cancerul pulmonar . Descoperirea faptului că epigenetica mediază procesul de modificare a modelelor de expresie genică ca răspuns la semnalele de mediu oferă o metodă nouă, potențial mai directă, pentru înțelegerea interacțiunilor dintre genom și mediu în boli precum cancerul.

După descoperirea genelor asociate cancerului, inclusiv genele supresoare tumorale și proto- oncogenele, cercetarea bazei genetice a cancerului s-a concentrat în principal pe alelele mutante ale genelor implicate în diverse funcții celulare, inclusiv ciclul celular, diferențierea, aderența și apoptoza . Până de curând , opinia convențională era că cancerul este de origine clonală și începe într-o celulă care a acumulat o serie de mutații dominante și recesive care îi permit să scape de mecanismele de control al ciclului celular . Mutațiile ulterioare permit celulelor tumorale să dobândească proprietăți metastatice și cancerului să se răspândească în alte părți ale corpului, unde apar noi tumori maligne. Mai multe linii convergente de cercetare clarifică rolul modificărilor epigenetice în inițierea și menținerea malignității. Aceste descoperiri ajută la explicarea proprietăților celulelor canceroase care sunt dificil de explicat exclusiv prin acțiunea alelelor mutante. Există acum dovezi ale rolului pe care modificările epigenetice îl joacă în cancer, ceea ce contestă paradigma convențională despre originea cancerului și stabilește că modificările epigenomice sunt una dintre principalele căi de formare și răspândire a celulelor maligne .

Relația dintre epigenetică și cancer a fost observată pentru prima dată în 1980 de Feinberg și Vogelstein, care au descoperit că celulele canceroase de colon aveau niveluri semnificativ mai scăzute de metilare decât celulele normale obținute din același țesut . Cercetări ulterioare efectuate de numeroși cercetători au demonstrat că hipometilarea globală este o caracteristică a tuturor cancerelor examinate până în prezent. În anii următori, a devenit clar că stările epigenetice ale celulelor normale sunt dramatic modificate în celulele canceroase și că alte modificări epigenetice, inclusiv hipermetilarea selectivă și reducerea la tăcere a genelor, sunt prezente și în celulele canceroase. În prezent, cancerul este considerat o boală care implică *atât* modificări epigenetice , *cât și genetice* , ducând la modificări ale expresiei genelor (Figura CE3.6).

Hipometilarea ADN-ului inversează inactivarea genelor, ducând la transcripția nerestricționată a multor grupe de gene, inclusiv a oncogenelor. De asemenea, relaxează controlul asupra genelor imprimate, permițând celulelor să dobândească noi caracteristici de creștere. Hipometilarea secvențelor repetitive de ADN în regiunile heterocromatice este asociată cu rearanjări cromozomiale crescute și modificări ale numărului de cromozomi, ambele fiind caracteristice celulelor canceroase. În plus, hipometilarea secvențelor repetitive duce la activarea transcripțională a secvențelor de ADN transpozabile, cum ar fi secvențele LINE și SINE, crescând și mai mult instabilitatea genomică.

Deși hipometilarea pe scară largă este o caracteristică a celulelor canceroase, hipermetilarea insulelor CpG și inactivarea anumitor gene, inclusiv a genelor supresoare tumorale (Tabelul CE3.2), se găsesc și în multe tipuri de cancer, adesea într-un model specific tumorii. De exemplu, *BRCA1* este hipermetilat și inactivat în cancerul de sân și ovarian, iar *MLH1* este hipermetilat în unele forme de cancer de colon. Se consideră că inactivarea prin hipermetilare a genelor supresoare tumorale joacă un rol important, complementar modificărilor mutaționale care însoțesc transformarea celulelor normale în celule maligne. De exemplu, într-o linie celulară de cancer de vezică urinară, o alelă a genei de control al ciclului celular *CDKN2A* este mutată, iar cealaltă alelă, normală, este inactivată prin hipermetilarea insulei sale CpG.

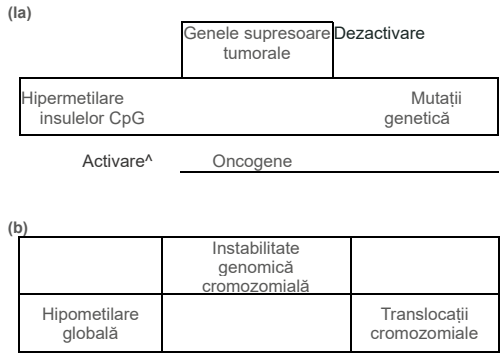


FIGURA CE3.6 Cancer: modificări epigenetice și mutaționale în genom .

Inactivarea ambelor alele permite acestor celule să scape de controlul ciclului celular și să se dividă continuu. În multe cazuri clinice, combinația dintre mutație și hipermetilare apare în formele ereditare de cancer.

TABLA CE3.2 Unele gene legate de cancer inactivate prin hipermetilare în cancerele umane

Gen	Locus Función		Cánceres relacionados
BRCA1	17q21	Repararea ADN-ului Semnalizarea nucleu-citoplasmă	Mama, ovario
APC	5q21	Repararea ADN-ului	Colorrectal, duodenal
MLH1	3p21	Punct de control al ciclului celular	Colon, estómago
RB1	13q14	Receptor nuclear pentru androgeni;	Retinoblastoma, osteosarcoma
AR	Xq11-12	activator transcripțional	Próstata
ESR1	6q25	Receptor nuclear pentru estrogeni; activator transcripțional	Mama, colorrectal

Cu toate acestea, și alte gene, pe lângă genele supresoare tumorale, sunt hipermetilate în unele celule canceroase ; acestea includ gene care controlează sau participă la repararea ADN-ului, diferențiere , apoptoză și rezistență la medicamente. De fapt, majoritatea genelor hipermetilate din celulele canceroase nu sunt gene supresoare tumorale , ceea ce sugerează că modelul de hipermetilare ar putea fi rezultatul unei disreglări generalizate a procesului de metilare , mai degrabă decât al unui singur eveniment țintă.

Pe lângă modelele de metilare alterate, multe celule canceroase au și profiluri anormale de modificare a histonei. În unele cazuri, mutațiile genelor care codifică membrii proteinelor histon acetiltransferază (HAT) și histon deacetilază (HDAC), care - modifică histonele, sunt legate de dezvoltarea cancerului . De exemplu, persoanele cu sindrom Rubenstein-Taybi moștenesc o mutație germinală care are ca rezultat HAT disfuncțional și au un risc de 300 de ori crescut de cancer. În alte cazuri, complexele HDAC sunt recrutate selectiv către genele supresoare tumorale de către proteinele oncogene mutante care leagă ADN-ul. Acțiunea complexelor HDAC asupra acestor gene conferă cromatinei o - configurație închisă și inhibă transcripția , determinând celula să piardă controlul asupra ciclului celular .

Mecanismele care provoacă modificări epigenetice în celulele canceroase nu sunt pe deplin înțelese , parțial pentru că apar într-un stadiu incipient al transformării celulelor normale în cele canceroase și parțial pentru că, până în momentul detectării cancerului, au avut deja loc modificări ale modelului de metilare. Faptul că astfel de modificări apar într -un stadiu foarte incipient al procesului de transformare a condus la ipoteza că inițierea modificărilor epigenetice care duc la cancer poate apărea în celulele stem care se află în țesutul normal. Există trei linii de dovezi care susțin această idee. În primul rând , mecanismele epigenetice pot înlocui mutațiile ca mijloc de reducere la tăcere a genelor supresoare tumorale individuale sau de activare a oncogenelor. În al doilea rând, hipometilarea globală poate duce la instabilitate genomică și la modificările cromozomiale la scară largă care caracterizează cancerul. În al treilea rând , deoarece modificările epigenetice pot reduce la tăcere mai multe gene, acestea sunt mai eficiente decât mutațiile secvențiale ale genelor individuale în transformarea celulelor normale în maligne. Figura CE3.7 prezintă un model de cancer bazat pe ideea că modificările epigenetice din celulele stem ale colonului inițiază evenimente de carcinogeneză, urmate de evenimente mutaționale.

Pe lângă schimbarea înțelegerii noastre asupra originilor cancerului, faptul că modificările epigenetice sunt potențial reversibile face posibilă dezvoltarea de medicamente terapeutice pentru tratamentul cancerului, cum ar fi o nouă metodă de chimioterapie. Terapia epigenetică se concentrează pe reactivarea genelor care au fost reduse la tăcere prin metilare sau modificarea histonei , reprogramând în esență modelul de expresie genică al celulelor canceroase. Mai multe medicamente concepute pentru a modifica modificările epigenetice ale genomului sunt în studii clinice, iar unul dintre ele (decitabina , comercializată sub denumirea de Vidaza) a fost aprobat în Statele Unite de către *Food and Drug Administration* pentru tratamentul leucemiei mieloide acute și sindromului mielodisplazic , un precursor al leucemiei. Acest medicament este un analog de citidină și este încorporat în ADN în timpul replicării în faza S a ciclului celular . Enzimele de metilare (metiltransferazele) se leagă ireversibil de decitabină, prevenind metilarea ADN-ului în multe alte situsuri și reducând eficient cantitatea de metilare din celulele canceroase . Alte medicamente care inhibă histone deacetilazele (HDAC) sunt, de asemenea, investigate pentru utilizarea în terapiile epigenetice . Experimentele cu linii celulare canceroase indică faptul că inhibarea activității HDAC duce la reexprimarea genelor supresoare tumorale . Un inhibitor HDAC aflat în prezent în studii clinice ar putea fi aprobat pentru tratamentul unor forme de limfom . Cercetări viitoare privind mecanismele și localizarea acestor modificări .

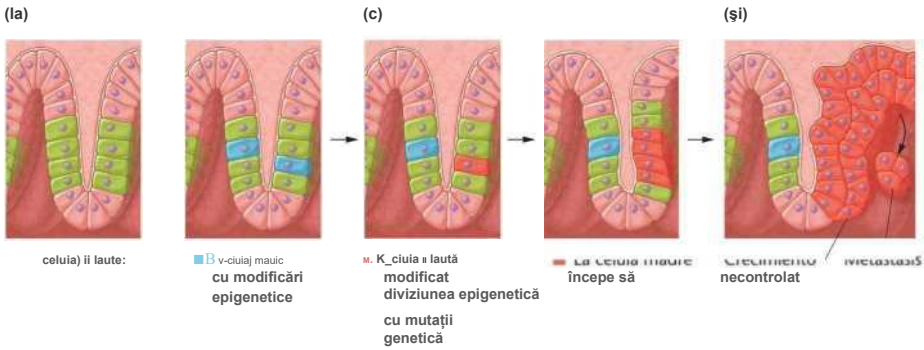


FIGURA CE3.7 **Model epigenetic al celulelor stem care propune că atât modificările epigenetice, cât și mutațiile sunt implicate în originea cancerului.**

Modificările epigenetice din genomul celulelor canceroase vor permite proiectarea unor medicamente mai puternice și mai specifice care vizează evenimentele epigenetice, ca formă de terapie împotriva cancerului.

Epigenetică și comportament

Un număr tot mai mare de dovezi demonstrează că modificările epigenetice, inclusiv modificările tiparelor de metilare și modificarea histonei, pot

RECUADRO 2

Qué más tenemos que saber sobre la epigenética y el cáncer

como los cambios genéticos en el origen, mantenimiento y metástasis de los cánceres ha abierto nuevas vías en la investigación del cáncer. Entre los descubrimientos clave sobre los mecanismos epigenéticos están el hallazgo de una desregulación de genes específica de cada tumor mediante perfiles alterados de metilación del ADN y de modificaciones de las histonas, el descubrimiento de que los cambios epigenéticos en histonas o en la metilación del ADN están interconectados, y el reconocimiento de que los cambios epigenéticos pueden afectar a cientos de genes en una sola célula cancerosa. Estos avances se han hecho en los últimos años y aunque está claro que la epigenética desempeña un papel clave en el cáncer, hay todavía que responder a muchas preguntas antes de poder sacar conclusiones sobre las contribuciones relativas de la genética y la epigenética al desarrollo del cáncer. Algunas de estas preguntas son las siguientes:

- **¿La hipometilación global en las células cancerosas es una causa o un efecto de la condición de malignidad?**
- **¿Dónde surgen principalmente estos cambios, en las células madre o en las células diferenciadas?**
- **Una vez que se han iniciado las alteraciones de la metilación, ¿qué activa la hipermetilación en las células cancerosas?**
- **¿Es la hipermetilación un proceso que tiene como objetivo determinados tipos de genes, o se trata de un suceso aleatorio?**
- **¿Podemos desarrollar fármacos que actúen sobre las células cancerosas e inviertan los cambios epigenéticos específicos del tumor?**
- **¿Podemos actuar sobre genes concretos para su reactivación, sin activar a otros?**

Aceste gene sunt componente importante ale fenotipurilor comportamentale . La șoareci, două regiuni ale creierului prezintă o expresie preferențială a genelor parentale. Într-una dintre aceste regiuni (hipotalamusul), imprimarea specifică sexului a fost mai evidentă la descendenții de sex feminin , sugerând efecte derivate din relațiile parentale asupra funcției acestei regiuni a creierului la fiice. În general, efectele dependente de relațiile parentale au fost demonstrate în peste 800 de gene, susținând ideea că imprimarea în diferite regiuni ale creierului poate reprezenta o formă importantă de reglare epigenetică.

La om, au fost documentate modificări epigenetice în evoluția tulburărilor neurodegenerative și a bolilor neuropsihiatrice cu fenotipuri comportamentale alterate. Modificări epigenetice ale sistemului nervos au fost documentate în cazuri de boală Alzheimer, boală Parkinson, boală Huntington și tulburări neuropsihiatrice, inclusiv schizofrenie și tulburare bipolară. Deoarece debutul acestor tulburări implică predispoziție genetică, evenimente de dezvoltare, efecte asupra mediului și existența efectelor epigenetice transgenerațională, a fost dificil să se definească rolul precis al modificărilor epigenomice în tulburările neurologice. În plus, diferite regiuni ale creierului la persoanele neafectate prezintă profiluri epigenetice distincte, adăugând o complexitate suplimentară interpretării rezultatelor. Poate cea mai semnificativă problemă este dificultatea obținerii țesutului cerebral pentru analiză. Majoritatea datelor privind modificările epigenetice au fost obținute din probe de autopsie, ceea ce face imposibilă stabilirea directă a unei corelații între aceste modificări și originea sau progresia acestor tulburări. Cu toate acestea, în ciuda acestor dificultăți, există dovezi considerabile care sugerează că, în viitor, epigenetica ar trebui luată în considerare și ca parte a diagnosticului și tratamentului acestor tulburări neurologice complexe.

Una dintre cele mai rapid dezvoltate și probabil cea mai - controversată teorie legată de epigenomică se referă la ideea că modificările epigenetice legate de indicii de mediu în timpul dezvoltării sau al primilor ani de viață influențează comportamentul ulterior (și sănătatea fizică) la vârsta adultă. Unul dintre primele studii privind epigenomica comportamentală, publicat de Szyf și Meaney și colegii săi în 2004, a demonstrat că variațiile comportamentului matern la șobolani acționează ca factori epigenetici, schimbând modul în care creierul puilor răspunde la stres la vârsta adultă. Șoarecii cu mame grijulii s-au adaptat mai bine la situațiile stresante decât șoarecii care nu au primit la fel de multă îngrijire. Atât la șobolani, cât și la oameni, stresul activează axa hipotalamo-hipofizo-adrenală (HPA), care amortizează răspunsul la stres prin creșterea nivelului de glucocorticoizi din sânge.

La șobolanii adulți care au primit îngrijire adecvată în primii ani de viață, expresia receptorilor glucocorticoizi (GR) în celulele regiunii hipotalamice a creierului a fost crescută. Acești receptori detectează nivelurile de glucocorticoizi din sânge și fac parte din bucla de feedback care reduce cantitatea de hormoni de stres eliberați de glandele suprarenale. Șobolanii adulți care au primit mai puțină îngrijire în timpul creșterii au prezentat niveluri mai ridicate de metilare și o transcripție redusă a genei receptorului GR. Nivelurile mai scăzute ale receptorului GR nu au atenuat răspunsul la stres la acești șobolani. Șobolanii care au primit îngrijire adecvată au avut cu 90% mai puțină metilare la un situs de legare a factorului de transcripție din regiunea promotorului GR, permițând astfel niveluri mai ridicate de transcripție GR, generând mai mulți receptori GR și reducând efectele stresului. La adulții care au primit mai puțină îngrijire maternă, medicamentele care au inversat nivelurile ridicate de metilare din promotorul GR au permis o transcripție GR mai mare. Aceasta, la rândul său, a inversat efectul îngrijirii deficitare la începutul vieții și a redus răspunsul la stres. Studiile ulterioare au arătat că femelele de șobolan cu mame mai solicite au fost mai solicite față de propriii urmași, demonstrând astfel rolul menținătorilor epigenetici în transmiterea acestor modificări urmașilor.

În urma acestor cercetări, studii suplimentare efectuate pe șobolani și șoareci au demonstrat că mediul înconjurător al animalelor gestante sau al nou-născuților afectează comportamentul și sănătatea puilor lor la vârsta adultă. Aceste experimente au arătat, de asemenea, că astfel de modificări comportamentale au fost mediate de metilarea epigenetică a ADN-ului și modificarea histonei, care alterează configurația cromatinei, ducând la modificări ale nivelurilor de expresie genică.

Extrapolarea acestor descoperiri la oameni a fost o sursă de controverse. S-a stabilit că adversitățile din viața timpurie, cum ar fi maltratarea în copilărie, cresc riscul de depresie și suicid. Ar putea fi implicată epigenetica? La oameni, există puține sau deloc dovezi directe că modificările epigenetice din creier în timpul vieții timpurii afectează comportamentul ulterior. De exemplu, unele studii arată o corelație între statutul socioeconomic scăzut (sărăcia infantilă) și bolile de inimă la vârsta adultă. Întrebarea este dacă modificările epigenetice sunt implicate în aceste situații și în situații similare. Deoarece nu este posibil să se obțină și să se analizeze probe de creier de la indivizi la intervale care se întind între copilărie și vârsta adultă, cercetătorii au folosit alte surse de materiale, cum ar fi sângele din cordonul ombilical și leucocitele. Rezultatele obținute cu aceste tipuri de celule nu au fost concludente în niciun caz. Invocarea modificărilor epigenetice pentru a explica rolul condițiilor de mediu în comportamentul și bolile adulților va depinde de rezultatele obținute din studiile efectuate cu țesuturile umane de interes, nu prin extrapolarea descoperirilor din experimente pe animale sau studii care utilizează tipuri de celule surogat.

Epigenetica și mediul înconjurător

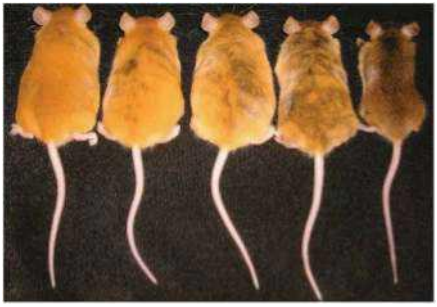
Agenții de mediu, inclusiv nutriția, compușii chimici și factorii fizici precum temperatura, pot altera expresia genelor, afectând starea epigenetică a genomului. La om, este dificil să se determine contribuțiile relative ale mediului sau ale comportamentului învățat ca factori în modificarea epigenomului, dar există dovezi că schimbările în nutriție și expunerea la agenți care afectează sistemul endocrin pot avea efecte asupra indivizilor din generațiile următoare.

Femeile însărcinate în timpul foametei din Olanda din 1944-1945 au avut copii cu risc crescut de obezitate, diabet și boli coronariene, iar membrii Generației F2 au prezentat, de asemenea, modele anormale de creștere în greutate și creștere. În Statele Unite, medicamentul dietilstilbestrol (DES) a fost prescris femeilor timp de câteva decenii, în convingerea că acesta ar putea preveni complicațiile sarcinii și avorturile spontane. Ulterior, s-a descoperit că fetele și tinerele care au fost expuse la DES în timpul dezvoltării prenatale au avut un risc de 40 de ori mai mare de a dezvolta cancer vaginal și, de asemenea, un risc mai mare de cancer la sân; utilizarea acestui medicament a fost întreruptă. Bărbații expuși la DES in utero nu au prezentat probleme fizice sau factori de risc identificabili, dar pot prezenta anomalii neurologice sau comportamentale. În plus, copiii femeilor care au luat DES au avut un risc mai mare de a avea copii cu malformații congenitale, menstruații neregulate și o frecvență mai mare decât în mod normal a infertilității. Modificarea epigenetică a modelelor de expresie genică în timpul embriogenezei poate explica transmiterea transgenerațională a acestor probleme de dezvoltare . Totuși, aceasta este în prezent o explicație discutabilă, deoarece nu există dovezi directe ale unei relații între DES și modificările epigenetice.

Cea mai clară dovadă a rolului factorilor de mediu în modificările epigenetice provine din studii efectuate pe animale de experiment. Hrănirea șobolanilor cu o dietă săracă în proteine în timpul sarcinii are ca rezultat modificări permanente ale expresiei mai multor gene la urmașii F1 și F2 . Expresia crescută a genelor hepatice este asociată cu hipometilarea regiunilor promotoare respective , iar dovezi suplimentare indică faptul că modificările epigenetice cauzate de această modificare a dietei au fost specifice genei .

La șoareci, culoarea blănii este controlată de alela dominantă *Agouti* (A). La șoarecii homozigoți AA , această alelă este activă doar într-un anumit moment al dezvoltării părului , producând o bandă galbenă pe un fir de păr negru, rezultând fenotipul agouti . O alelă mutantă neletală (A'") are ca rezultat formarea unui pigment galben de-a lungul întregii tije a firului de păr , producând o blană galbenă . Această alelă rezultă din inserarea unui element transpozabil în apropierea locului de inițiere a transcripției genei Agouti . Un element promotor din cadrul transpozonului este responsabil pentru această modificare a expresiei genelor. Gradul de metilare din promotorul transpozonului este legat de cantitatea de pigment galben depusă în tija firului de păr și variază de la individ la individ. Rezultatul este o variație largă a culorii blănii la șoarecii identici genetic (Figura CE3.8), variind de la galben (nemetilat) la pseudoagouti (puternic metilat). Pe lângă gradația culorii blănii, există și o gradație a greutății corporale. Șoarecii galbeni sunt mai obezi decât șoarecii pseudoagouti maro . Alelele de acest fel, care prezintă o expresie variabilă de la un individ la altul în tulpini genetic identice datorită modificărilor epigenetice, se numesc *epialele metastabile* . Termenul metastabil se referă la natura modificabilă a modificărilor epigenetice , iar termenul epială se referă la ereditabilitatea stării epigenetice a alelei.

Pentru a evalua rolul factorilor de mediu în modificarea epigenomului, dieta șoarecilor gestanți a fost suplimentată cu precursori de metilare, inclusiv acid folic , vitamina B1 și colină. La urmași , variația culorii blănii a fost redusă și s-a deplasat spre fenotipul pseudoagouti. Această schimbare a culorii blănii a fost însoțită de o metilare crescută a promotorului transpozonului . - Profiluri de metilare



Galben ușor pătat puternic pseudo-pătat agouti pătat

FIGURA CE3.8 Expresie variabilă a fenotipului galben la șoareci, cauzată de modificări epigenetice ale genomului legate de dietă.

Alela *Avy* din țesuturile care reprezintă cele trei tipuri principale de celule ale corpului (ectoderm, mezoderm și endoderm) a fost, de asemenea, modificată, arătând ^{ca} metilarea alelei Avr *a avut loc* într-un stadiu incipient al dezvoltării embrionare, înainte de diferențierea celulelor stem embrionare. Aceste descoperiri au implicații pentru bolile epigenetice la om. De exemplu, riscul de cancer colorectal este direct legat de deficitul de folat din dietă și de diferențele în activitatea enzimelor care duc la sinteza donorilor de metil.

Proiecte epigenome

Vom încheia discutând câteva proiecte lansate pentru a cartografia epigenomul uman, inclusiv Proiectul Foaia de parcurs a epigenomilor al NIH. Acest proiect se bazează pe ideea că multe aspecte ale sănătății și susceptibilității la boli sunt legate de reglarea epigenetică sau de reglarea inadecvată a activității genelor. Programul se concentrează asupra modului în care mecanismele genetice care controlează diferențierea celulelor stem și formarea organelor generează răspunsuri biologice la stimuli externi și interni care cauzează boli. Atlasul Epigenomului Uman este unul dintre programele din cadrul Proiectului Foaia de parcurs a epigenomilor al NIH . Atlasul compilează și catalogheză date despre un set de epigenomi umani care servesc drept standarde de referință ; este utilizat pentru a oferi informații detaliate despre modificările epigenomice în anumite loci, tipuri de celule , stări fiziologice și genotipuri . Acest atlas permite cercetătorilor să efectueze analize integrative și comparative ale datelor epigenomice din regiuni genomice specifice sau genomuri întregi .

Un alt proiect, Proiectul Epigenomului Uman , este un consorțiu public - privat multinațional înființat pentru a identifica , cartografia și determina semnificația funcțională a tuturor modelelor de metilare a ADN-ului din genomul uman. Analiza acestor modele de metilare poate dezvălui faptul că răspunsurile genetice la semnalele de mediu mediate de modificările epigenetice reprezintă o cale către dezvoltarea bolilor . Deși aceste proiecte sunt în stadii incipiente , informațiile deja disponibile sugerează cu tărie că ne aflăm în pragul unei noi ere în genetică , una în care putem studia impactul factorilor de mediu asupra genomului la nivel molecular . Rezultatele acestor proiecte pot ajuta la explicarea modului în care factorii de mediu din viața timpurie pot influența predispoziția la boli la vârsta adultă .

Lecturi *și* resurse selectate

Articole din reviste

Burdge, GC și Lillicrop, KA 2010. Nutriție, epigenetică și plasticitate a dezvoltării: implicații pentru înțelegerea bolilor umane . *Ann. Rev. Nutr.* 30: 315-339.

Butler, MG 2009. Tulburări de imprimare genomică la om: o scurtă trecere în revistă. J. Assist. Reprod. Genet. 20: 477-486.

Dulac, C. 2010. Funcția creierului și plasticitatea cromatinei. *Nature* 465: 728-735.

Iacobuzio-Donahue, CA 2009. Modificări epigenetice în cancer. *Ann. Rev.* Pathol. Meeh. Dis. 4: 229-249.

Petronis, A. 2010. Epigenetica ca principiu unificator în etiologia trăsăturilor și bolilor complexe. *Nature* 465: 721-727.

Relton, CI și Smith, GD 2010. Epidemiologia epigenetică a bolilor complexe comune : perspective pentru predicție, prevenire și tratament. *PLoS Medicine 7:* (10) e!000356.

Site-uri web

Foaia de parcurs pentru epigenomică a Institutelor Naționale de Sănătate. http://www.nihroadmap.nih.gov/epigenomics/initiatives.asp

Proiectul Epigenomului Uman, www.epigenome.org

Atlasul epigenomului uman , http://www.genboree.org/epigenomeatlas/index.rhtml

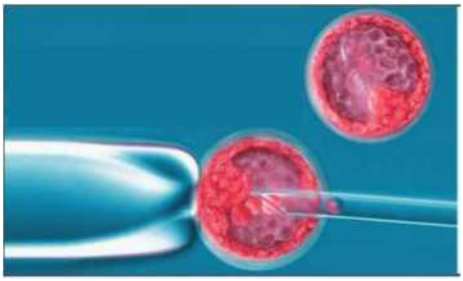
Grupul de Epigenetică Computațională. http://www.computational-epigenetics.de

CAPITOLELE SPECIALE DESPRE GENETICA MODERNĂ

CAPITOLUL SPECIAL 4

Células madre

Micul grup de celule prezentat în Figura CE4.1(a) oferă o fotografie interesantă; imagini de acest gen au apărut în mass-media și în publicații științifice din întreaga lume. Pentru cei care nu sunt oameni de știință, acest mic grup de celule poate să nu însemne prea mult; cu toate acestea, în interiorul său se află celule care sunt, probabil, cele mai controversate și intens examinate din întreaga biologie. Acest grup de celule este un embrion uman în...



(la)

Celulele stem au un mare potențial și par foarte promițătoare în aplicații regenerative pentru tratamentul bolilor umane.

(b)

FIGURA CE4.1 Celule stem embrionare ale unei ființe umane.
(a) Izolarea celulelor stem embrionare umane (HESC). Un embrion uman aflat în stadii incipiente de dezvoltare, ținut de o pipetă (stânga), este utilizat pentru a izola HESC-urile folosind o pipetă de aspirație

(dreapta).
(b) Un CMEH izolat care crește într-o cultură.

stadii incipiente de dezvoltare, care sunt utilizate pentru izolarea celulelor stem [Figura CE4.1 (b)]. Celulele stem evocă reacții emoționale și controverse din partea oamenilor de știință, a clerului, a politicienilor și a publicului larg. Pentru unii oameni, izolarea și utilizarea acestor celule provoacă entuziasm, frică, furie și o gamă largă de alte emoții.

O mare parte din entuziasmul generat de celulele stem în comunitățile științifice și medicale provine din enormul lor *potențial* neexploatat și netestat pentru tratarea bolilor umane *(a se vedea* tabelul CE4.1) prin intermediul medicinei regenerative - crearea de celule, țesuturi și organe pentru repararea și înlocuirea țesuturilor sau organelor. În acest mini-capitol, vom explora ce sunt celulele stem și proprietățile lor unice, vom examina diferite surse de celule stem și modul în care acestea pot fi izolate sau produse și, în final, vom lua în considerare potențialele aplicații ale celulelor stem. De asemenea, vom analiza reglementările care guvernează utilizarea celulelor stem și problemele etice pe care le ridică.

TABLA CE4.1

Tulburare	Numărul de pacienți din Statele Unite
Boli cardiovasculare	58 de milioane
Boli autoimune	30 de milioane
Diabet	16 milioane
Osteoporoză	10 milioane
Cancere	8,2 milioane
Boala Alzheimer, boala Parkinson, arsuri (severe),	5,5 milioane 5,5 milioane
leziuni ale măduvei spinării,	0,3 milioane
malformații congenitale	0,25 milioane
	0,15 milioane/an

Populația de potențiali pacienți din Statele Unite pentru terapii bazate pe celule stem

Tulburările enumerate mai jos se manifestă în multe feluri *și* Prin urmare, nu toți cei cu aceste boli ar putea beneficia de terapii bazate pe celule stem. Cu toate acestea , prevalența pe scară largă a acestor tulburări sugerează că cercetarea celulelor stem ar putea ajuta milioane de americani.

Sursa: **Perry (2000).**

Ce sunt celulele stem?

Biologii dezvoltării știu despre celulele stem de zeci de ani, dar abia relativ recent aceste celule au atras o atenție extraordinară în cadrul comunității științifice globale. Așadar, ce sunt celulele stem și ce le face atât de atractive pentru repararea țesuturilor și organelor deteriorate? După cum vom vedea în curând, există multe tipuri diferite de celule stem, dar, în general , toate au în comun două caracteristici de bază care le disting de alte tipuri de celule (Figura CE4.2): autoreînnoirea și diferențierea în tipuri de celule specializate .

1. Autoreînnoire: celulele stem cresc și se divid (proliferează) la nesfârșit prin mitoză, pentru a crea populații de celule stem identice.
2. tipurile de celule și țesuturi din organism. Sub controlul unor semnale cheie, celulele stem se pot diferenția în tipuri de celule specializate, cum ar fi celulele pielii, mușchilor, oaselor sau sângelui .

Așa cum s-a explicat în Capitolul 18, diferențierea este un proces complex care implică numeroase gene care trebuie activate și reduse la tăcere conform unor modele de expresie atent coordonate în timp , iar celulele diferențiate depind de semnale chimice , cum ar fi factorii de creștere și hormonii de la alte celule, pentru a se schimba . Unele celule stem au o capacitate mai mare de diferențiere decât altele , iar oamenii de știință se referă la această capacitate *ca* potențial *de diferențiere* . a tipului de celulă. O celulă totipotentă, cum ar fi zigotul, poate forma nu numai toate tipurile de celule ale corpului adult, ci și țesuturile specializate necesare - dezvoltării embrionare, cum ar fi placenta . Multe tipuri de celule stem sunt numite pluripotente deoarece au potențialul de a se diferenția în cele din urmă într-o varietate de tipuri distincte de celule , pentru a forma cele 220 de tipuri de celule ale corpului uman .

Surse și tipuri de celule stem

De unde provin celulele stem? Inițial, se credea în general că celulele stem sunt prezente doar în embrioni. Acum știm că există mai multe surse și diferite tipuri de celule stem. Pentru a înțelege ce sunt celulele stem, trebuie să analizăm diferitele tipuri de celule stem.

O celulă stem poate
1. Auto-reînnoire sau
2. Diferențierea de sine într-un tip celulă specializată

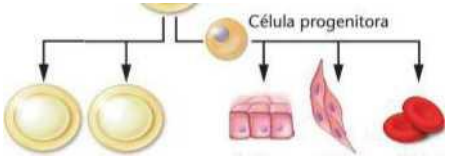


FIGURA CE4.2 Caracteristicile unei celule stem.
Autoreînnoirea şi diferenţierea în diferite tipuri de celule sunt două caracteristici fundamentale ale celulelor stem.

celule stem, trebuie să analizăm pe scurt dezvoltarea-

Dezvoltarea unui embrion uman (Figura CE4.3). După cum știm, după fertilizarea cu un spermatozoid și un ovul, ovulul fertilizat se numește zigot. Zigotul se divide rapid și după trei până la cinci zile formează o bilă compactă de aproximativ 12 celule numită morulă, care înseamnă „dud mic". Aproximativ cinci până la șapte zile după fertilizare, diviziunea celulară creează un embrion format dintr-un grup gol de aproximativ 100 de celule numit blastocist. Blastocistul are un diametru de aproximativ o șapteme de milimetru și are un strat exterior de celule individuale, *trofoblastul;* acest strat se dezvoltă pentru a forma partea fetală a...

În 1998, James Thomson de la Universitatea din Wisconsin , Madison, a publicat că primele celule stem embrionare umane

(HSC) au fost izolate și cultivate dintr-un blastocist uman . Thomson cultivase celule stem embrionare (ESC) de la maimuțe rhesus cu doi ani mai devreme. Tot în 1998, John Gearhart și colegii săi de la Universitatea Johns Hopkins au izolat celule germinale embrionare - celule primitive care formează gameți (spermatozoizi și ovule) - din țesutul fetal uman și au arătat că aceste celule se pot dezvolta în diferite tipuri de celule. Pentru a izola HSC-urile, oamenii de știință folosesc o pipetă de susținere care aplică o scurtă aspirație pentru a „ține" blastocistul la locul său [a se vedea Figura CE4.1(a)] și apoi introduc o micropipetă .

Inițial, principala sursă de SMC-uri au fost embrionii excedentari produși prin tehnologii de reproducere.

placenta que nutre al embrión en desarrollo (Figura CE4.3).

Dentro del blastocisto hay un pequeño grupo de unas 30 células que forman una estructura denominada masa celular interna. La masa celular interna es la fuente de células madre embrionarias humanas (CMEH o hESC por sus siglas en inglés). Durante el desarrollo embrionario, las células de la masa celular interna se desarrollan para formar el propio embrión, y las CMEH pueden diferenciarse para formar todos los tipos de células del cuerpo. Las CMEH son

pluripotentes, al igual que otros tipos de células que veremos más adelante en este capítulo especial.

ta de vidrio en el blastocisto para extraer delicadamente células de la masa celular interna, las cuales se cultivan luego en placas y matraces en el laboratorio.

A estos descubrimientos siguieron los trabajos de otros científicos que habían aislado células madre en especies como los ratones, los cerdos, las vacas, los conejos y las ovejas. Los investigadores de células madre atribuyen mucho de lo que ahora se sabe acerca del aislamiento de las CMEH a los trabajos pioneros realizados con ratones en la década de 1980.

Celulele stem adulte (ASC) sunt prezente în organele și țesuturile mature.

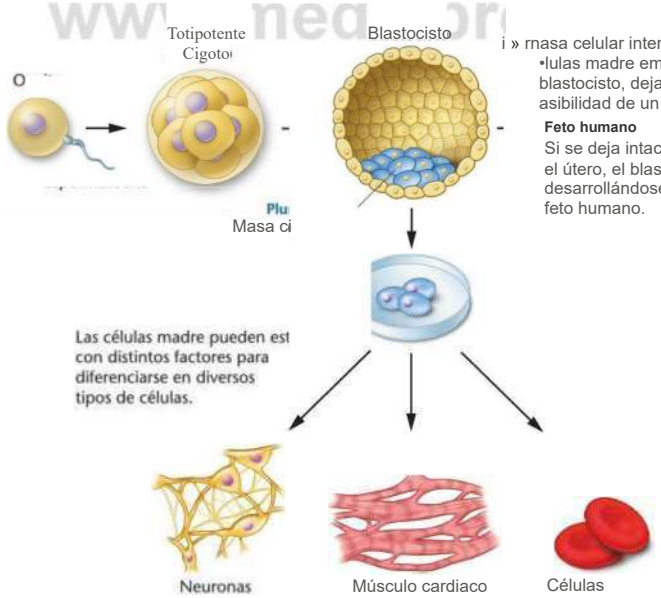


FIGURA CE4.3 Aislamiento y cultivo de células madre embrionarias humanas. Las células aisladas de la masa celular interna de embriones humanos pueden hacerse crecer en cultivo como fuente de CMEH. Bajo condiciones de crecimiento apropiadas, las CMEH pueden ser estimuladas para diferenciarse en prácticamente todos los tipos celulares del cuerpo.

Tehnologiile de reproducere asistată, cum ar fi fertilizarea in vitro (FIV), sunt utilizate pentru a produce embrioni . În FIV, mai multe ovule sunt prelevate de la o femeie și fertilizate *in vitro*. Embrionii rezultați sunt apoi transferați în uterul femeii , dar, de obicei, doar câțiva sunt implantați. Embrionii suplimentari sunt de obicei congelați la - temperaturi extrem de scăzute pentru utilizare ulterioară de către cuplu. Alternativ, acești embrioni pot fi distruși sau, cu consimțământul cuplului, donați pentru cercetare. Numai în Statele Unite, se estimează că există aproximativ 400.000 de embrioni generați prin FIV depozitați în clinici.

Celulele stem embrionare umane evită parțial senescența (îmbătrânirea celulară) deoarece exprimă niveluri ridicate de telomerază. Mai multe grupuri au menținut celulele stem timp de peste trei ani și peste 600 de cicluri de diviziune fără probleme aparente. Celulele cultivate ca acestea, care pot fi menținute și crescute succesiv, se numesc linii celulare. Celulele stem cresc, de asemenea, rapid și pot fi congelate pentru perioade lungi de timp, păstrându-și în același timp proprietățile.

Stimularea CME pentru diferențiere

În condiții adecvate, atunci când sunt stimulate cu diferiți factori, liniile de celule stem embrionare și alte tipuri de celule pe care le vom studia în acest capitol pot fi diferențiate în diverse tipuri de celule *in vitro* (Figura CE4.3). Această *diferențiere direcționată* a celulelor stem în celule diferențiate specifice de interes este esențială pentru crearea de țesuturi pentru aplicații medicale regenerative. Obiectivul principal al cercetării celulelor stem este determinarea factorilor care controlează pluripotența celulelor stem și identificarea factorilor care stimulează diferențierea celulelor stem în tipuri specifice de celule. Aceste semnale includ substanțe cunoscute sub numele de factori de creștere, hormoni și proteine mici (peptide) care stimulează diferențierea în forme specifice de țesut. Multe dintre aceste semnale activează factorii de transcripție specifici țesuturilor și etapelor de dezvoltare, care, la rândul lor, direcționează diferențierea celulelor stem pluripotente în tipuri de celule diferențiate.

De exemplu, sistemele de semnalizare care implică factorul de creștere transformant α (TGF-β1), proteinele morfogenetice osoase (BMP) și alți factori de diferențiere a creșterii acționează asupra unei gene corespunzătoare unui factor de transcripție numit *Na-nog*. Na-nog este o proteină fundamentală care menține celulele stem umane (HSC) într-o stare pluripotentă, nediferențiată. În laborator , în condiții de cultură adecvate, HSC-urile de la oameni, șoareci, șobolani și alte specii au fost diferențiate într-o multitudine de tipuri de celule, inclusiv celule ale pielii ; celule ale creierului (neuroni și celule gliale, cum ar fi oligodendrocitele, care susțin, hrănesc și protejează neuronii); cardiomiocite (precursori ai celulelor musculare cardiace) ; cartilaj (condrocite); celule beta pancreatice care secretă insulină; spermatozoizi și osteoblaste (celule formatoare de oase); și celule hepatice (hepatocite). Celule musculare, inclusiv celule musculare netede care formează pereții vaselor de sânge ; celule musculare scheletice, care formează mușchii care se atașează de scheletul și îl mișcă ; și celule miocardice (miocite), care formează pereții musculari ai inimii. Odată diferențiate, oamenii de știință examinează adesea celulele pentru a depista expresia genelor specifice tipului de celulă, deoarece aceasta este o modalitate de a confirma tipul de celulă produsă. De exemplu, atunci când celulele se diferențiază în drocite din celulele stem, se constată că acestea exprimă un factor de transcripție condrogenic numit *SOX9*.

Celule stem adulte (ASC)

Cercetarea cu celule stem embrionare umane (HESC) este extrem de controversată din cauza originii acestor celule stem embrionare - embrionii umani . Multă vreme s-a crezut că embrionii aflați într-un stadiu incipient de dezvoltare erau principala și poate singura sursă de celule stem ; cu toate acestea , celulele stem adulte (ASC) există în țesuturile diferențiate ale corpului . ASC-urile apar în număr mic, dar pot fi izolate; acestea au fost obținute din creier, intestin, păr, piele, pancreas, măduvă osoasă, grăsime, glandele mamare, dinți, mușchi, sânge și practic din toate țesuturile adulte (Figura CE4.3).

Cei care se opun cercetării celulelor stem susțin adesea că celulele stem adulte (ASC) sunt o alternativă mai acceptabilă la celulele stem embrionare (ESC), deoarece izolarea primelor nu necesită distrugerea unui embrion. Celulele stem adulte pot fi obținute de la oricine prin efectuarea de biopsii prin aspirație cu ac fin, care implică introducerea unui ac cu diametru subțire în țesutul muscular sau osos. De asemenea, este posibil să se izoleze ASC-urile de la cadavre . De asemenea, știm că ASC-urile sunt prezente în țesutul adipos , care ar putea fi o sursă importantă de celule stem, mai ales având în vedere că peste 500.000 de litri de țesut adipos provenit din liposucție și alte proceduri chirurgicale cosmetice sunt aruncați în fiecare an în Statele Unite . Experimentele au arătat că celulele stem adulte din anumite țesuturi se pot diferenția într-un tip de celulă diferit, specializat. De exemplu, o ASC izolată din țesutul muscular ar putea fi utilizată pentru a dezvolta o celulă sanguină . Cu toate acestea , alte studii au arătat că AMC-urile nu pot fi la fel de pluripotente ca HMC-urile.

Sunt necesare mult mai multe cercetări pentru a determina dacă celulele adulte vor fi la fel de valoroase precum se așteaptă să fie celulele stem embrionare umane.

Celule stem din lichidul amniotic

Celulele stem pot fi izolate din lichidul amniotic uman , lichidul protector care înconjoară fătul în curs de dezvoltare. În laborator, aceste celule stem din lichidul amniotic au fost convertite cu succes în neuroni, celule musculare, adipocite, oase, vase de sânge și celule hepatice. Nu este complet clar dacă aceste celule sunt cu adevărat diferite de celulele stem umane (HSC) sau de celulele stem cu adenină (ASC), dar dacă sunt, ar putea duce la un progres dramatic în tehnologiile celulelor stem.

Celulele stem canceroase

Celulele stem canceroase (CSC) , numite și celule inițiatore de tumori, au fost identificate și se știe că sunt asociate cu dezvoltarea cancerului, progresia tumorii, metastazele tumorale și recurența cancerului. La fel ca celulele stem normale , CSC-urile se pot autoreînnoi și diferența pentru a forma țesuturile din care au fost derivate. Anumite CSC cresc lent în grupuri sau *nișe* dintr-un țesut. Proprietățile CSC-urilor, altele decât capacitatea lor de a forma o tumoare, nu sunt pe deplin clare. Cercetătorii nu sunt siguri dacă CSC-urile sunt derivate din celule normale care au suferit mutații sau dacă sunt implicate în rezistența tumorilor canceroase la chimioterapie, dar aceste celule fac obiectul unor cercetări intense și ar putea duce la dezvoltarea de tratamente terapeutice pentru cancer *in vivo* . sau *in vitro.* Conceptul de pluripotență nu este complicat, însă ceea ce nu este atât de ușor este determinarea potențialului unei linii de celule stem.

Un test fundamental pentru stabilirea pluripotenței este determinarea dacă celulele stem pot forma cele trei *straturi germinale majore:* ectodermul, mezodermul și endodermul. În timpul dezvoltării embrionare, masa celulară internă formează trei straturi de țesut specializate - straturile germinale majore - care apoi dau naștere țesuturilor specifice ale corpului. Stratul cel mai exterior, ectodermul , dă naștere țesuturilor epiteliale, cerebrale și nervoase. Stratul mijlociu, sau mezodermul, dă naștere celulelor sanguine, inimii, oaselor, rinichilor, mușchilor și cartilajului . Stratul cel mai interior, endodermul , produce plămânii , ficatul și sistemul digestiv. *In vitro,* s-a demonstrat că celulele stem embrionare (ESC) se diferențiază în tipuri de celule care reprezintă celule care ar proveni din straturile germinale majore . *Testele in vitro* sunt adesea folosite și pentru a determina dacă celulele stem se pot agrega pentru a forma un grup de celule numit corp embrioid.

Biologii specializați în celule stem utilizează teste *in vivo* pentru a demonstra pluripotența ca modalitate de validare a viabilității celulelor stem, în special a derivatelor de celule stem (SCD). În aceste teste, SCD-urile sunt injectate în șoareci pentru a vedea dacă celulele răspund la semnale *in vivo* pentru a stimula dezvoltarea țesuturilor. Șoarecii imunodeficienți - cei cărora le lipsește un sistem imunitar - sunt utilizați astfel încât șoarecii gazdă să nu respingă celulele stem injectate. Odată ce celulele stem sunt introduse în acești șoareci, se formează tumori, inclusiv teratoame (Figura CE4.4). În cadrul acestor tumori, se formează de obicei țesuturi diferențiate, iar aceste tumori

Pruebas para determinar la pluripotencialidad

Cuando los científicos trabajan con células madre —bien con células aisladas tales como las CMEH o las CMA, o con células creadas mediante reprogramación nuclear, las cuales estudiaremos en la siguiente sección— un aspecto importante de la investigación es comprobar la pluripotencialidad de las células aisladas. Esto es importante para determinar si las células son capaces de formar otros tipos de células y esta propiedad es indicativa del potencial de una célula madre para hacerlo *in vivo* o *in vitro.* Resulta que las células embrionarias son pluripotentes durante un periodo de tiempo relativamente corto del desarrollo. Cuando se aíslan y cultivan apropiadamente, las CME pueden mantenerse en un estado pluripotente *in vitro* de forma indefinida. Frecuentemente, se crean poblaciones heterogéneas de CMEH en las que las células tienen distintas capacidades para diferenciar

FIGURA CE4.4 Teratoma. Un teratoma es una masa de tejido desorganizado que puede crearse de forma natural en los individuos, pero que también puede producirse cuando se prueban las células madre para comprobar su pluripotencialidad. Los teratomas típicamente constan de una masa desorganizada de tejido, que incluye varios ripos de tejido diferenciado, como pelo, piel y hueso. Aquí se muestra un diente creciendo dentro de un teratoma.

pot fi analizate pentru a determina ce tipuri de țesuturi s-au dezvoltat. Aceste tipuri de tumori apar ca o masă dezorganizată de celule, deși adesea conțin și multe celule și țesuturi diferențiate, inclusiv părți de os, păr și dinți. Ocazional, aceste tumori dau naștere și la celule de carcinom embrionar (CE), care au proprietăți de celule stem și au fost frecvent utilizate în trecut în diverse aplicații experimentale , inclusiv crearea de animale transgenice. Formarea teratomelor demonstrează un aspect al potențialului liniilor de celule stem.

Pentru mulți oameni de știință, cea mai semnificativă demonstrație a pluripotenței *in vivo* implică injectarea de celule stem embrionare (ESC) într-un embrion în curs de dezvoltare, aflat în stadiul de blastocist. Fătul rezultat poate fi apoi examinat pentru a determina dacă ESC-urile injectate au contribuit la dezvoltarea celor trei straturi germinale majore (Figura CE4.5). De exemplu, așa cum se arată în Figura CE4.5, dacă ESC-urile de la un șoarece negru sunt injectate într-un embrion de șoarece alb, aflat în stadiul de blastocist, șoarecele născut din acest blastocist himeric va avea o blană pestriță , cu celule de blană atât negre, cât și albe. De asemenea, pot fi urmăriți și alți markeri genetici pentru a determina ce celule provin din ESC-urile injectate, inclusiv expresia proteinelor și genelor tisulare umane, dacă acestea au fost injectate într-un blastocist de șoarece. Desigur, atunci când se lucrează cu CMEH, se utilizează șoareci pentru a efectua aceste teste de pluripotență, injectând CMEH în embrioni de șoarece, deoarece din punct de vedere etic acest tip de experiment nu poate fi efectuat cu embrioni umani.

Atât *in vivo* , cât și *in vitro,* o gamă largă de tehnici moleculare sunt utilizate în mod curent pentru a examina potențialul tuturor tipurilor de celule stem. Aceste tehnici includ examinarea stării de metilare a ADN-ului în genele pluripotente specifice celulelor, căutarea unui număr de markeri proteici specifici celulelor stem care sunt de obicei analizați în celulele stem, dar nu și în alte tipuri de celule , și studii bazate pe microarray pentru a analiza modelele de expresie genică specifice celulelor stem.

Trebuie să discutăm despre o altă sursă importantă de celule stem care îi face pe oamenii de știință deosebit de optimiști în ceea ce privește aplicațiile lor. Însă aceste celule nu sunt izolate folosind un embrion sau un țesut adult ca sursă de celule stem ; în schimb, oamenii de știință folosesc reprogramarea nucleară pentru a converti celulele diferențiate în celule stem. Deoarece această tehnică este extrem de complexă, vom analiza aceste celule separat în secțiunea următoare.

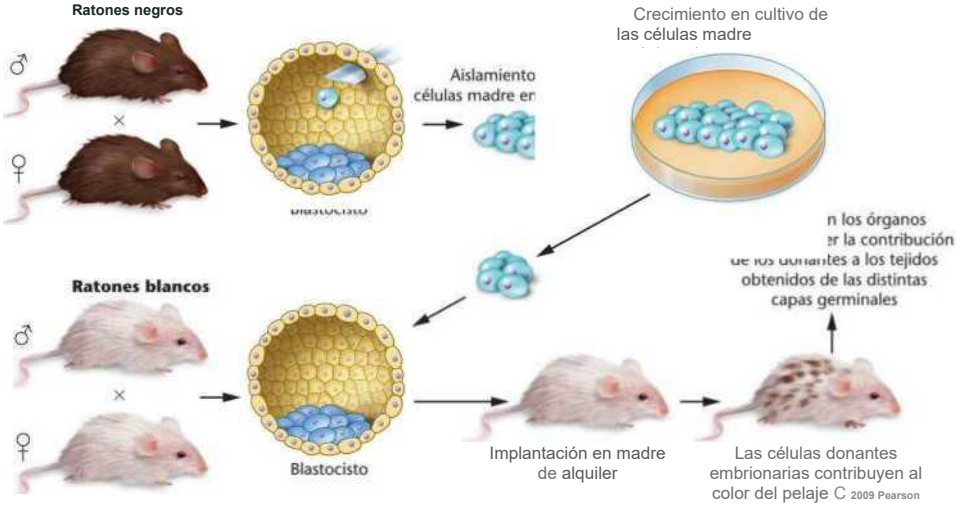

Ratones negros
Crecimiento en cultivo de las células madre
Aislamiento células madre em
Ratones blancos
Blastocisto
Implantación en madre de alquiler
Las células donantes embrionarias contribuyen al color del pelaje
© 2009 Pearson

FIGURA CE5.5 Pruebas para determinar la pluripotencialidad. Probar que las CME son pluripotentes y que pueden contribuir a todos los tejidos es importante para evaluar la viabilidad de las células madre. En este ejemplo, células madre embrionarias de ratón procedentes de un embrión obtenido de ratones con pelaje negro, se transfieren a un blastocisto obtenido de ratones con pelaje blanco. Cuando este blastocisto híbrido se implanta en un ratón hembra de alquiler, los embriones resultantes serán ratones quiméricos. Si las células madre negras son verdaderamente pluripotentes, se formarán varios tejidos, que representan el desarrollo de las tres capas germinales principales, a partir tanto de las células madre blancas como negras.

Tehnici de reprogramare nucleară pentru producerea de celule stem pluripotente

Cercetarea în biologia celulelor stem este un domeniu extrem de activ. Una dintre principalele domenii de studiu o reprezintă tehnicile alternative care permit producerea de celule stem pluripotente fără a distruge embrionii. Una dintre cele mai promițătoare tehnici recente pentru crearea și izolarea celulelor stem fără utilizarea embrionilor este reprogramarea nucleară a celulelor somatice . Se credea odată că odată ce celulele se diferențiază într-un anumit tip de celulă specializată, de exemplu, o celulă epitelială, diferențierea lor este ireversibilă. Cu toate acestea, acum știm că nu este cazul. Oamenii de știință lucrează la reprogramarea destinului celular de aproximativ 50 de ani, iar în ultimii ani, biologii specializați în celule stem au lucrat intens în acest domeniu, concentrându-și eforturile pe producerea de celule stem pluripotente fără a distruge embrionii. Ideea de bază este de a lua o celulă adultă diferențiată și de a-i modifica modelele de expresie genică pentru a o reprograma și a o readuce la o etapă anterioară a căii sale de diferențiere - adică, pentru a readuce celulele la o stare pluripotentă nediferențiată. Mecanismele prin care celulele sunt reprogramate pentru a reveni la o stare pluripotentă sunt în mare parte necunoscute. Prin urmare, reprogramarea nu este atât de ușoară pe cât ar putea părea. De exemplu, modificările epigenetice care apar într -un genom pe măsură ce o celulă se diferențiază pot fi dificil de eliminat sau de inversat. Unii oameni de știință au ridicat obiecții semnificative cu privire la faptul dacă celulele reprogramate mențin stări epigenetice stabile sau dacă, dimpotrivă, apar modificări în schimbările epigenetice, cum ar fi metilarea ADN-ului sau - modificările histonei, în celulele reprogramate.

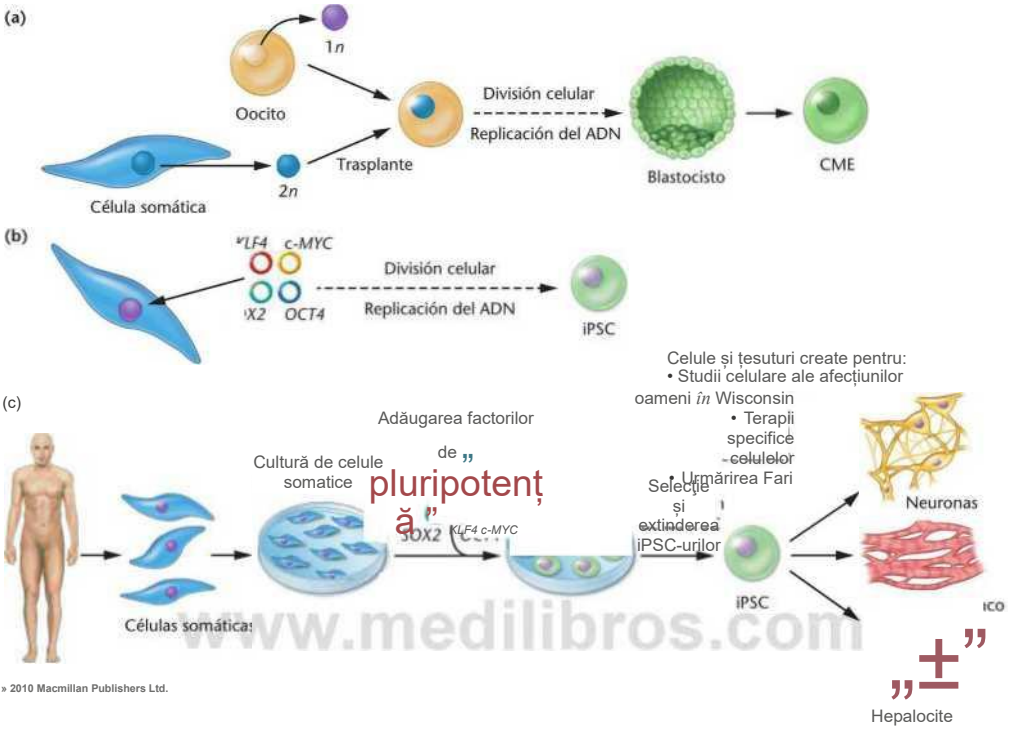
În prezent, există mai multe tehnici care permit reprogramarea nucleară (Figura CE4.6). De exemplu, transferul nuclear al celulelor somatice implică transplantul unui nucleu de celule somatice într-un ou enucleat (reamintim că aceasta este tehnica utilizată pentru clonarea oii Dolly). Reprogramarea nucleară a genomului celulelor somatice este inițiată, iar un embrion se formează pe baza genelor exprimate de genomul celulelor somatice . Embrionul rezultat poate crește până la stadiul de blastocist și poate fi utilizat pentru izolarea celulelor stem embrionare [Figura CE4.6(a)], deși această metodă nu este deosebit de eficientă pentru generarea de SCM-uri. Celulele somatice pot fi, de asemenea, fuzionate cu celule stem în scopul reprogramării celulelor somatice. Una dintre primele tehnici de reprogramare de succes a implicat fuzionarea SCM-urilor cu celule epiteliale numite fibroblaste . Celulele hibride rezultate au prezentat mai multe proprietăți ale SCM-urilor *in vitro și in vivo.*

O a treia tehnică de reprogramare nucleară utilizează gene ale factorilor de transcripție pentru a induce reprogramarea și a crea celule stem pluripotente induse (iPSC).

Celule stem pluripotente induse

Mai multe laboratoare au reprogramat cu succes anvelopele nucleare ale celulelor somatice de la șoareci adulți, oameni și porci pentru a crea iPSC-uri. Această tehnică a fost aclamată ca o revoluție în domeniul cercetării biologiei celulelor stem , demonstrând potențialul său excepțional ca modalitate alternativă de a genera celule stem . În 2006, Shinya Yamanaka de la Universitatea Kyoto, Japonia, a creat primele iPSC-uri. Yamanaka a folosit retrovirusuri pentru a livra patru transgene - *Oct4, Sox2, c-myc* și *Klf4* - fibroblastelor de șoarece (Figura CE4.6(b)). Expresia acestor patru gene, care codifică factorii de transcripție implicați în dezvoltarea celulară , a reprogramat fibroblastele, ducându-le într-un stadiu anterior de diferențiere și producând iPSC-uri. Aceste iPSC-uri prezintă multe proprietăți ale celulelor stem (SCSC), cum ar fi autoreînnoirea și pluripotența, și par a fi imposibil de distins de SCSC-uri. Aceste celule stem iPS exprimă, de asemenea, gene precum *Nanog* și Oct, care sunt markeri caracteristici despre care se știe că sunt exprimați în celulele stem stem nediferențiate. Alte - experimente au arătat că celulele iPS se pot diferenția în alte tipuri de celule, inclusiv celule neuronale și miocardice . Oamenii de știință folosesc, de asemenea, această strategie pentru a converti atât celulele stem, cât și cele non - stem în alte tipuri de celule . De exemplu, fibroblastele de șoarece au fost convertite *in vitro în* neuroni funcționali . utilizând o combinație a factorilor de transcripție *Ascii, Brn2, Pou3f2* și Mytll .

Bazându-se pe munca lui Yamanaka, celulele iPSC au fost produse din celule umane, de șobolan și de maimuță . Cercetătorii în domeniul iPSC au folosit, de asemenea, metoda lui Yamanaka pentru a crea șoareci din iPSC (reamintim că mai devreme în capitol am explicat că această tehnică este esențială pentru demonstrarea pluripotenței) pentru a determina că celulele reprogramate sunt extrem de pluripotente. În aceste experimente, cercetătorii au fuzionat un embrion format din două celule pentru a forma un blastocist tetraploid , unicelular .



AG URA CE4,6 Reprogramarea nucleară pentru producerea de celule stem pluripotente, (a) Transfer nuclear pentru a crea celule stem embrionare dintr-o celulă somatică, (b) Transducția factorilor de transcripție pentru a crea celule iPSC, inclusiv iPSC-uri specifice pacientului (c).

care dezvoltă o placentă, dar nu celulele embrionare necesare pentru a deveni un corp. Celulele iPSC de șoarece au fost apoi injectate în aceste blastociste tetraploide, iar acestea au fost transferate unei mame surogat. Celulele iPSC injectate au determinat dezvoltarea blastocistelor în embrioni, iar un procent mic (22 de nașteri din 624 de embrioni transferați) de blastociste a produs șoareci vii, deși, evident, unii dintre șoarecii creați din iPSC au avut o probabilitate mare de a muri. Cu toate acestea , reprogramarea ADN-ului celulelor adulte și generarea de indivizi identici genetic folosind iPSC-uri ar putea fi o nouă modalitate de a clona mamiferele adulte.

În 2007, două grupuri de cercetare diferite au demonstrat că au obținut cu succes celule stem pluripotente induse specifice pacientului prin reprogramarea celulelor epiteliale umane prelevate direct de la un voluntar [Figura CE4.6(c)]. Un grup de cercetare a reprogramat celule epiteliale prelevate de pe fața unei femei în vârstă de 36 de ani și celule din țesutul conjunctiv de pe articulațiile unui bărbat în vârstă de 69 de ani, în timp ce celălalt grup a utilizat celule epiteliale din prepuțul unui nou-născut de sex masculin.

Recent, au fost generate și celule stem iPSC fără a utiliza gena c-MYC. Acesta este un progres potențial important, deoarece se știe că c-MYC este o oncogenă (o genă care provoacă cancer).

Cercetătorii încearcă, de asemenea, să evite problemele asociate cu integrarea aleatorie în genom , care apare atunci când vectorii retrovirali sunt utilizați pentru a furniza gene pentru programare . Nuclear. O tehnică a implicat introducerea proteinelor OCT4, SOX2, c-MYC și KLF4 în celule somatice adulte pentru a le reprograma în iPSC-uri, eliminând astfel necesitatea vectorilor - virali pentru reprogramare. Celulele stem neuronale umane au fost, de asemenea, utilizate pentru a produce iPSC-uri prin introducerea proteinei OCT4 în aceste celule - fără adăugarea de gene sau a celorlalți trei factori de transcripție . Producerea de iPSC-uri fără vectori virali

rămâne un punct central de atenție pentru cercetătorii iPSC .

În 2010, cercetătorii de la Școala de *Medicină Mount Sinai* au demonstrat că celulele epiteliale fetale din lichidul amniotic pot fi ușor reprogramate în iPSC-uri, cu o eficiență mai mare decât alte celule somatice. În cadrul acestei cercetări, celulele epiteliale obținute din lichidul amniotic au fost cultivate și transfectate cu plasmide care exprimă *Oct4, Sox2, c-myc* și Klf4 . Celulele iPSC dezvoltate folosind această tehnică au prezentat modele de expresie genică caracteristice celulelor stem și activității telomerazei și au fost capabile să se diferențieze atât *in vivo* , cât și *in vitro.*

Aceste rezultate promițătoare cu celulele stem iPSC demonstrează că reprogramarea nucleară este o modalitate potențial viabilă de a genera celule stem specifice donatorului, fără a fi nevoie de embrioni sau celule stem embrionare. Aceste celule ar putea fi utilizate în terapii celulare specifice pacientului [Figura CE4.6(c)J]. În plus, cu tehnologiile iPSC, este teoretic posibil să se creeze celule stem specifice bolii pentru fiecare pacient în parte. De exemplu, o biopsie tisulară, cum ar fi țesutul pielii, ar putea fi prelevată de la o persoană cu o anumită boală și reprogramată în celule stem, care ar putea fi apoi utilizate pentru a crea tipuri de celule care combat boala . Celulele iPSC specifice pacientului ar putea fi utilizate pentru terapii celulare fără riscul de respingere imună, dar chiar și cei mai optimiști cercetători cred că astfel de terapii celulare nu vor fi gata decât cel puțin un deceniu sau poate mai mult.

Oamenii de știință sunt, de asemenea, foarte interesați să vadă cum pot fi utilizate celulele reprogramate de la pacienți pentru a studia bolile în laborator. Culturile de celule reprogramate de la pacienți bolnavi sunt studiate pentru a ajuta oamenii de știință să înțeleagă mai bine progresia și procesele bolilor umane, precum și pentru a efectua teste de screening pentru medicamente, în vederea determinării eficacității potențialelor tratamente medicamentoase în celulele bolnave. Laboratoarele din întreaga lume creează celule iPSC de la pacienți bolnavi și le diferențiază în țesuturile afectate de o anumită boală, astfel încât aceste boli să poată fi modelate *in vitro* , iar celulele să fie utilizate pentru tratamente medicamentoase.

Ca exemplu al tehnicii utilizate pentru generarea de celule iPSC specifice pacientului pentru persoane cu anumite boli, cercetătorii de la Institutul Harvard pentru Celule Stem și alți colaboratori au folosit fibroblaste de la pacienți cu scleroză laterală amiotrofică (SLA; boala Lou Gehrig) pentru a crea celule neuronale, neuroni motori și celule de suport (celule gliale) numite astrocite. SLA este o boală neurodegenerativă fatală, fără leac. Aceasta provoacă deteriorarea neuronilor motori din creier și măduva spinării, ducând la o pierdere progresivă a abilităților motorii, inclusiv a capacității de a merge, vorbi și respira. Munca desfășurată la Harvard a reprezentat un progres esențial deoarece, deși s-au înregistrat progrese semnificative în identificarea defectelor genetice asociate cu boli neurodegenerative precum SLA, boala Parkinson și boala Alzheimer, lipsesc modele tisulare sau animale adecvate pentru efectuarea de studii *in vivo sau in vitro* pentru a înțelege mai bine aceste boli și a dezvolta tehnici de tratament.

După cum se arată în Figura CE4.7, fibroblastele au fost prelevate de la două surori în vârstă cu mutații asociate SLA (una dintre surori dezvoltase SLA) în gena

CT4
SOX2
< U.f4
C-MYC

Factorii de transcripție

©AAAS

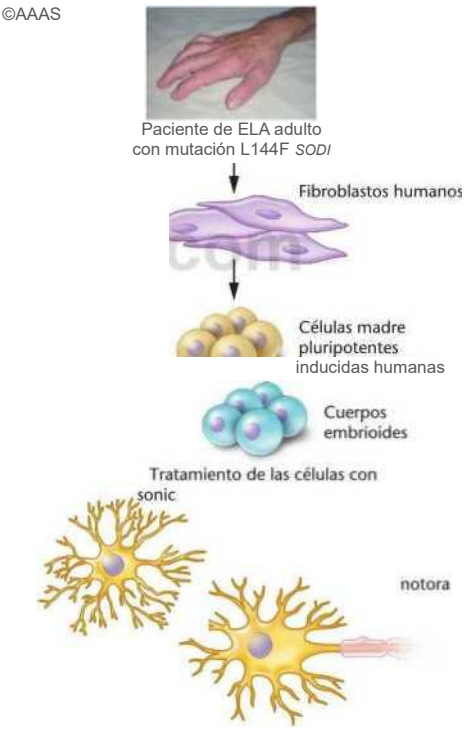


FIGURA CE4.7 Generarea de iPSC-uri specifice pacientului pentru pacienții cu scleroză laterală amiotrofică (SLA). Fibroblastele din biopsiile cutanate a două surori în vârstă cu mutații asociate SLA în gena *SOD1 au fost* utilizate pentru a crea iPSC-uri specifice pacientului, care au fost diferențiate în neuroni motori și astrocite.

în superoxid dismutază *(SODI*). Aceste celule au fost apoi tratate cu acid retinoic și proteină sonic hedgehog pentru a stimula diferențierea iPSC și a genera neuroni motori și astrocite. Această lucrare a demonstrat fezabilitatea generării de iPSC specifice pacientului pentru persoanele în vârstă cu boli; rezultatele sale pot fi foarte promițătoare pentru cercetătorii care studiază funcția neuronilor motori la pacienții cu SLA și dezvoltă terapii pentru SLA și alte boli neurodegenerative.

Se pare că celulele iPSC ne permit să evităm unele dintre controversele juridice și etice asociate cu celulele iPSC de tip EMSC. Însă, chiar dacă sunt atât de promițătoare, acestea prezintă o serie de provocări care vor trebui abordate. De exemplu, oamenii de știință încă nu înțeleg pe deplin cum funcționează celulele iPSC pluripotente sau cum ar putea fi mai bine controlat potențialul lor. În plus,

- Producția de iPSC este relativ ineficientă (doar aproximativ una din 1.000 de celule somatice expuse tehnicilor de reprogramare devine un iPSC);
- Acestea necesită hrănire constantă pentru a menține linii celulare viabile;
- Acestea prezintă o viabilitate scăzută în comparație cu alte tipuri de celule odată ce sunt depozitate congelate;
- poate fi predispus la formarea de tumori;
- Ocazional, acestea prezintă diferențiere spontană în tipuri de celule mature atunci când sunt în cultură și
- Uneori poate fi dificilă dirijarea diferențierii în anumite tipuri de celule.

Cercetarea iPSC progresează într-un ritm incredibil și interesant, pe măsură ce oamenii de știință lucrează pentru a înțelege mai bine proprietățile și capacitățile acestor celule.

Celule stem pluripotente induse de ARN

La sfârșitul anului 2010, un articol care descria o tehnică de transformare a celulelor mature în iPSC a atras o atenție considerabilă datorită utilizării unei tehnici noi care putea fi utilizată pentru a reprograma rapid și în siguranță celulele adulte pentru a crea un tip de celule stem numite celule stem pluripotente induse de ARN (RiPS *)*. Celulele RiPS au fost generate din celule somatice folosind un amestec de *molecule de ARN corespunzătoare transcrierilor aceloraşi gene utilizate în* reprogramarea tradițională *(OCT4, SOX2, c-MYC* și *KLF4)*. Această tehnică a făcut posibilă producerea de iPSC-uri în aproximativ jumătate din timp (două - săptămâni, comparativ cu peste o lună necesară pentru iPSC-urile obținute folosind alte tehnici) și, datorită acestora , aproximativ 4 % din celulele tratate au putut fi reprogramate . Acest lucru face ca această metodă să fie de aproximativ 100 de ori mai eficientă decât tehnicile de administrare a genelor descrise anterior pentru obținerea de iPSC-uri . Rămâneți pe față pentru noi evoluții interesante din anii următori privind reprogramarea nucleară , iPSC-uri și RiPSC-uri .

Aplicații potențiale ale celulelor stem

Centrul *Național pentru Statistică Umană* din partea organizației *Centrelor pentru Controlul și Prevenirea Bolilor* Statele Unite raportează că aproximativ 3.000 de americani mor zilnic din cauza unor boli care ar putea fi într-o zi tratate cu tehnologii bazate pe celule stem . În viitor , cercetarea celulelor stem ar putea avea un impact asupra vieții a milioane de oameni din întreaga lume . Aplicațiile promițătoare și controversele din jurul celulelor stem au făcut ca cercetarea acestor celule și a subiectelor conexe să fie un subiect regulat al programelor de știri de televiziune și al paginilor ziarelor din multe țări . Celulele stem au multiple aplicații potențiale - de la utilizarea lor pentru a cultiva țesuturi sănătoase la studierea lor pentru a înțelege și trata malformațiile congenitale și bolile genetice , la manipularea genetică a celulelor stem pentru a transmite gene în tehnicile de terapie genică sau crearea de țesuturi întregi în laborator folosind tehnici de inginerie tisulară . Mulți oameni de știință cred că tehnologiile bazate pe celule stem vor juca un rol esențial în dezvoltarea de tratamente pentru boli precum accidentul vascular cerebral , bolile cardiovasculare , boala Parkinson , boala Alzheimer , SLA, leziunile cronice ale măduvei spinării , diabetul și altele (Tabelul CE4.1).

Se vorbește frecvent despre *potențialul* și a *perspectivelor promițătoare* Deși discuțiile despre aplicațiile celulelor stem au fost în curs de desfășurare , acestea nu s - au materializat încă într-o utilizare pe scară largă pentru tratarea bolilor . Un număr alarmant de clinici nereglementate și neaprobate din întreaga lume utilizează celule stem (o simplă căutare pe Google va confirma acest lucru) și le promovează eficacitatea în tratarea și vindecarea bolilor . Aici , ne vom limita la

a lua în considerare exemple reprezentative de aplicații ale celulelor stem de până acum. Deși ne vom concentra pe tehnologiile moderne ale celulelor stem, unele aplicații există de zeci de ani . De exemplu, transplanturile de măduvă osoasă sunt o formă de terapie cu celule stem. Măduva osoasă conține celule stem adulte . În timpul unui transplant de măduvă osoasă, celulele stem sunt transferate de la un donator sănătos la un primitor care are nevoie, unde regenerează diferite tipuri de celule sanguine, după cum este necesar.

Pacienții cu leucemie, o formă de cancer care determină divizarea anormală a globulelor albe , producând celule imature, necesită adesea chimioterapie sau radioterapie pentru a distruge - globulele albe defecte. Drept urmare, chimioterapia și radiațiile slăbesc considerabil sistemul imunitar al pacientului. Tratamentele pentru leucemie pot include și transfuzii de sânge pentru a înlocui globulele albe și roșii deteriorate de chimioterapie. Utilizarea celulelor stem pentru a produce globule albe devine o modalitate eficientă de a trata leucemia. În plus, celulele stem din sângele cordonului ombilical au fost, de asemenea, utilizate pentru a furniza globule roșii pacienților cu anemie falciformă și alte afecțiuni ale sângelui. Izolarea celulelor stem din sângele cordonului ombilical devine atât de populară încât, în multe state americane, mulți părinți pot alege să plătească pentru congelarea celulelor stem din sângele cordonului ombilical pe termen nelimitat , în cazul în care copilul lor va avea nevoie de ele în viitor .

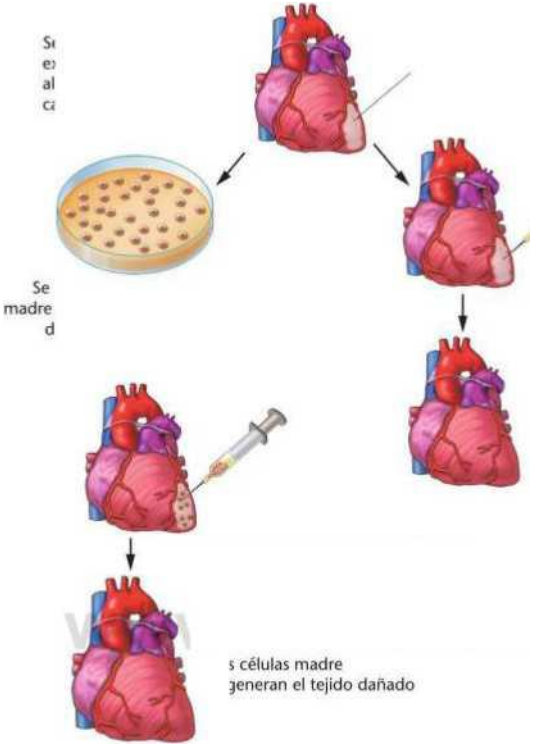
Este important să înțelegem că cele mai eficiente și sigure tratamente cu celule stem din viitor vor implica, cel mai probabil, diferențierea celulelor stem *in vitro* pentru a obține tipurile de celule și țesuturi dorite și apoi introducerea acestor celule într-un pacient în mod corespunzător, mai degrabă decât injectarea directă a celulelor stem într-o persoană. Până în prezent, cercetările care utilizează celule stem multipotente sau pluripotente, de orice - origine, pentru introducerea la animale sau pacienți s-au confruntat cu probleme insurmontabile . Care este principala problemă? Principala problemă este cum să controlăm diferențierea celulelor stem pentru a obține țesuturile de interes atunci când celulele stem sunt injectate în orice țesut, cum ar fi mușchiul scheletic . Atunci când celulele stem sunt introduse în acest mod , este dificil de controlat modul în care acestea vor răspunde *in vivo la* semnalele de diferențiere ; ca urmare, ele se dezvoltă adesea în multe tipuri de celule și țesuturi diferite și nedorite, care nu au nicio legătură cu aplicația preconizată.

Până în prezent, au existat mai multe rezultate promițătoare în modele animale și studii clinice pe oameni care utilizează celule stem pentru repararea țesuturilor . Repararea țesutului cardiac a demonstrat un potențial enorm. Atacurile de cord sunt o cauză principală de deces în Statele Unite, ucigând aproape o jumătate de milion de oameni în fiecare an. Celulele stem ar putea fi utilizate pentru a înlocui celulele miocardice deteriorate sau moarte după traume, cum ar fi un atac de cord. Celulele miocardice adulte nu se vindecă corect de la sine.

Moartea celulelor miocardice slăbește inima și o poate împiedica să bată cu o forță suficientă pentru a menține fluxul sanguin normal. Mai multe grupuri de cercetare au utilizat cu succes celule stem adulte în modele animale pentru a îmbunătăți funcția cardiacă după un atac de cord. De exemplu, cercetătorii au injectat cu succes celule stem ASC din măduva osoasă de șoarece, precum și celule ASC umane, în zone deteriorate ale inimii unui șoarece (Figura CE4.8). Aceste celule stem se pot diferenția în celule miocardice, pot forma conexiuni electrice cu celule musculare sănătoase și pot îmbunătăți funcția cardiacă cu peste 35%. O tehnică similară a fost utilizată pentru transplantul de celule ASC umane în peretele ventricular al porcilor cu inimi deteriorate , precum și la participanți umani la studii clinice. În ambele exemple, celulele stem transplantate s-au diferențiat în celule miocardice care au restabilit un procent semnificativ de activitate electrică și contractilitate în zonele deteriorate. Unul dintre studii a utilizat celule stem extrase din sângele cordonului ombilical uman pentru a îmbunătăți funcția cardiacă la șobolani.

Încă nu este clar cât timp pot rămâne viabile celulele stem utilizate în aceste experimente sau cât timp poate fi eficient acest tip de tehnică. Oamenii de știință lucrează cu sârguință la metode de monitorizare neinvazive (folosind tehnici molecular-genetice) și tehnologie de imagistică diagnostică pentru a urmări evoluția celulelor stem transplantate. Oamenii de știință sunt optimiști și cred că această abordare ar putea funcționa într-o zi și la oameni. Ar putea fi posibil ca, în viitor, un medic să comande câteva grame de celule miocardice de la un laborator de medicină regenerativă pentru a fi transplantate unui pacient care a suferit un atac de cord, similar modului în care chirurgii de astăzi solicită sânge de la o bancă de sânge pentru o transfuzie în timpul unei proceduri chirurgicale?

Advanced Cell Technology, din Massachusetts, SUA, desfășoară un studiu clinic care utilizează CMEH-uri pentru a trata o formă rară de degenerare retiniană care provoacă orbire. Această cercetare a fost al doilea studiu clinic care utilizează CMEH-uri aprobat de FDA . Cercetătorii de la Universitatea Emory din Atlanta, Georgia, lucrează la un studiu de fază I, aprobat de FDA în 2009, pentru a...



ectan medicaments a men te
en el Corazón ^5 ti mular el
crecimiento paración a partir
Rezidenții CMA

FIGURA CE4.8 Repararea unei inimi deteriorate folosind celule stem adulte. Celulele stem de șoarece și umane au fost utilizate pentru a repara zonele inimii șoarecelui afectate de atacuri de cord.

vezici urinare este, desigur, o realizare impresionantă, dar crearea unui organ care este în

madre
el tejido dañado

© 2009 Pearson Education, Inc

esență doar un rezervor de stocare a urinei este destul de diferită de crearea unui organ cu o multitudine de țesuturi diferite și capacități funcționale mai complexe - cum ar fi splina, pancreasul sau plămânul . Cu toate acestea , aceste rezultate sunt exemple promițătoare despre ceea ce ne putem aștepta de la medicina regenerativă în viitor.

În ultimii ani, cercetătorii au demonstrat că ideea îndelungată că creierul și măduva spinării umane nu pot produce neuroni noi era falsă. Ei au izolat

Acest studiu examinează siguranța celulelor stem injectate direct în măduva spinării pacienților cu SLA. Este primul studiu clinic de acest fel care utilizează celule stem pentru tratarea SLA în Statele Unite. Oamenii de știință nu se așteaptă ca celulele stem injectate să creeze noi neuroni motori, dar cred că celulele stem pot proteja neuronii motori funcționali de efectele SLA, încetinind astfel progresia bolii.

Oamenii de știință care lucrează în medicina regenerativă sunt, de asemenea, deosebit de optimiști în ceea ce privește capacitatea lor de a produce organe viabile din celule stem. Imaginați-vă - posibilitatea fabricării rinichilor, vezicilor urinare, splinelor și altor organe din celule stem și existența unui stoc de organe gata pentru transplant. Aceste organe ar fi proiectate astfel încât să nu conțină proteine cheie de suprafață, împiedicându-le să fie recunoscute și respinse de sistemul imunitar al receptorului; de fapt, acestea ar putea fi apoi transplantate fără prea multe griji pentru respingerea imună. Aceste posibilități, însă, rămân în mare parte speculative. Bucăți de piele și alte organe, cum ar fi vezicile urinare, au fost create in *vitro* (Figura CE4.9) . În acest exemplu, s-au folosit materiale biodegradabile pentru schele structurale pentru a modela vezica urinară, după care celulele stem au fost plantate pe schelă și diferențiate pentru a forma țesuturile vezicii urinare. Crearea unei

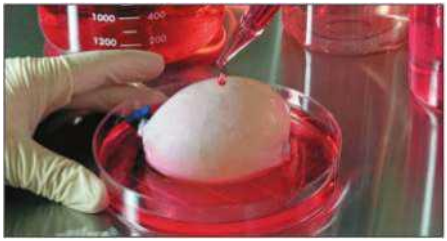


FIGURA CE4.9 Vezică urinară creată din celule stem umane.

Celule stem adulte au fost descoperite în creier și utilizate pentru a crea neuroni în cultură. Oamenii de știință au demonstrat deja că aceste celule stem se pot diferenția în neuroni, care pot fi apoi injectați în șoareci și șobolani pentru a îmbunătăți funcția neurologică la animalele cu leziuni ale măduvei spinării . Cercetătorii de la Universitatea Johns Hopkins au demonstrat că - transplanturile de celule stem umane pot permite șobolanilor cu membrele posterioare paralizate să meargă. Multe companii au anunțat date preclinice care indică faptul că celulele stem neuronale derivate de la oameni pot fi utilizate pentru a restabili funcția motorie pierdută la șoareci cu leziuni ale măduvei spinării . EDA a aprobat primul studiu clinic din Statele Unite care utilizează celule CMEH pentru a trata pacienții cu leziuni ale măduvei spinării. Studiile sunt efectuate de compania de biotehnologie Geron Corporation, cu sediul în California . Deși mai sunt multe de făcut în domeniul reparării și regenerării măduvei spinării, cercetătorii sunt optimiști că transplanturile de celule stem neurologice ar putea fi gata pentru studii clinice umane în următorii trei până la cinci ani, oferind speranță atâtor persoane afectate de leziuni ale măduvei spinării.

Celule P5C pentru tratamentul anemiei falciforme

Rudolph Jaenisch și colegii săi de la Institutul de Tehnologie din Massachusetts au stârnit un entuziasm considerabil în 2007, când au raportat prima aplicație terapeutică a iPSC-urilor. Jaenisch și colegii săi au folosit iPSC-uri pentru a corecta anemia falciformă la un șoarece homozigot pentru alela β-globinei umane (alela anemiei falciforme). În această lucrare, cercetătorii au folosit un model umanizat de șoarece cu anemie falciformă, numit astfel deoarece este o tulpină de șoarece în care genele globinei murine au fost înlocuite cu gene umane (folosind o *tehnică „knockin"),* inclusiv alela β-globinei umane (Figura CE4JO). Acești șoareci umanizați prezintă multe dintre simptomele cheie, cum ar fi

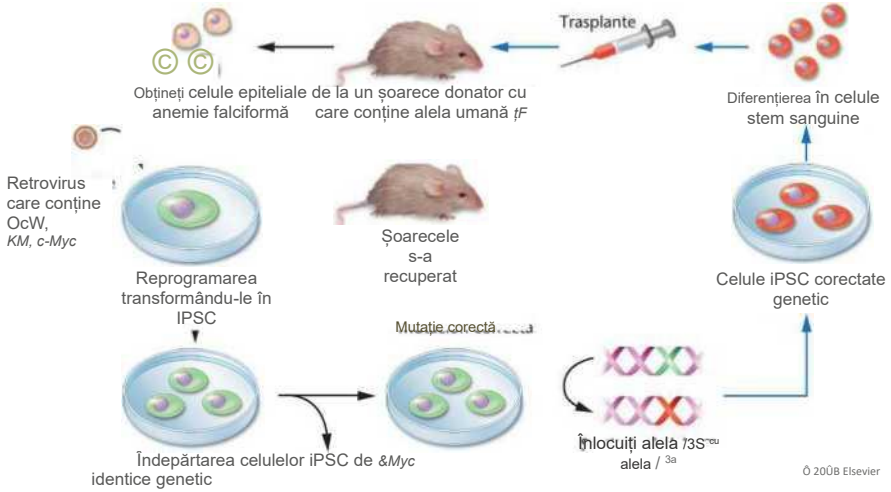

Trasplante
Obțineți celule epiteliale de la un șoarece donator cu anemie falciformă
care conține alela umană tF
Diferențierea în celule stem sanguine
Retrovirus care conține OcW, KM, c-Myc
Reprogramarea transformându-le în IPSC
Șoarecele s-a recuperat
Celule iPSC corectate genetic
Mutație corectă
Înlocuiți alela
alela /
Îndepărtarea celulelor iPSC de &Myc identice genetic
Ô 20ÛB Elsevier

FIGURA CE4.1 Celule iPSC pentru tratamentul anemiei falciforme. iPSC-urile au fost utilizate pentru a reduce efectele anemiei falciforme într-un model umanizat de șoarece. Săgețile albastre arată calea de utilizare a iPSC-urilor corectate cu gena globină-umanizată pentru a trata în mod adecvat șoarecele donator.

Celulele epiteliale au fost izolate de la șoareci adulți la care globina fusese umanizată, iar celulele au fost reprogramate folosind retrovirusuri care codifică cele patru gene discutate anterior în capitol, când s-au descris iPSC-urile: *(Oct4, Sox2, c-myc* și *Klf4)*.

Oamenii de știință au folosit apoi recombinarea omoloagă - pentru a corecta celulele stem hematopoietice iPSC, înlocuind alela *[F]* a genei β-globinei cu alela /? ^{A} (alela necauzătoare de boală; Figura CE4.10). Celulele iPSC corectate au fost diferențiate in *vitro pentru* a obține celule progenitoare hematopoietice, care au fost ulterior transplantate la șoareci anemici cu alele care fuseseră iradiate pentru a distruge globulele roșii. Celulele iPSC transplantate au restaurat celulele stem hematopoietice ale șoarecilor bolnavi și au redus considerabil simptomele anemiei falciforme. Deși rămân multe obstacole de depășit înainte ca astfel de tehnici să fie viabile pentru tratarea bolilor umane, această lucrare de pionierat a generat un optimism considerabil cu privire la potențialul de tratare a bolilor umane cu iPSC.

Clonarea terapeutică

Când clonarea reproductivă a mamiferelor a devenit posibilă prin transfer nuclear de celule somatice, a devenit clar că tehnici similare puteau fi utilizate pentru clonarea terapeutică. Scopul clonării reproductive este de a produce urmași. Dolly a fost primul dintre multe alte mamifere care a fost produs prin donare reproductivă. Spre deosebire de clonarea reproductivă, clonarea terapeutică ar putea furniza celule stem care reprezintă o compatibilitate genetică perfectă pentru un pacient care necesită un transplant. În clonarea terapeutică, conceptul de bază este că genomul celulei somatice a unui pacient (de exemplu, celule epiteliale) ar putea fi injectat într-un ovul enucleat - un ovul din care nucleul a fost îndepărtat - și apoi stimulat să se dividă în cultură pentru a crea un embrion (Figura CE4.11). Embrionul rezultat nu ar fi utilizat pentru a produce urmași; în schimb, ar fi lăsat să se dezvolte timp de câteva zile până când ar ajunge la stadiul de blastocist, moment în care ar fi utilizat pentru a obține celule stem embrionare. Celulele stem izolate din acest embrion ar putea fi apoi cultivate și introduse în pacientul care a donat celulele somatice utilizate pentru a obține celulele stem embrionare (Figura CE4.11).

Înainte de dezvoltarea iPSC-urilor, clonarea terapeutică era văzută ca o modalitate posibilă de a furniza celule stem specifice pacientului, care ar putea fi utilizate pentru tratarea bolilor fără teama de respingere imună de către receptor, deoarece receptorul ar fi sursa originală a celulelor.

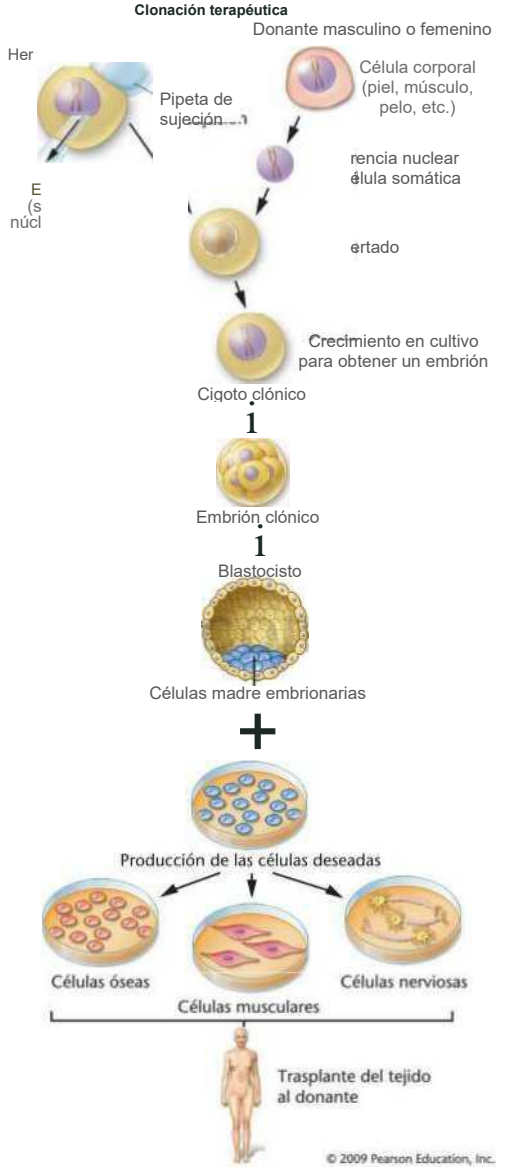


FIGURA CE4.11 Clonación terapéutica. En la clonación reproductiva, el objetivo es obtener una cría clonada. En la clonación terapéutica, se fabrican células madre genéticamente idénticas a las células extraídas de un paciente, con el fin de proporcionar una terapia de células madre específica del paciente.

Celule. În teorie, celulele stem ale unui pacient ar putea fi folosite și pentru a crea linii celulare de la oameni cu boli genetice, oferind oamenilor de știință oportunități fără precedent de a studia și de a afla mai multe despre bolile umane. Spunem „în teorie" deoarece clonarea terapeutică nu a fost încă dovedită a funcționa la oameni.

Mulți oameni de știință nu agreează termenul *clonare terapeutică,* deoarece pare să implice crearea unei clone umane. Însă crearea de celule stem pentru tratarea bolilor umane nu este același lucru cu clonarea unei ființe umane. Odată cu dezvoltarea celulelor stem iPSC , mulți oameni de știință care au susținut clonarea terapeutică își îndreaptă acum atenția către iPSC-uri pentru a evita problemele etice asociate cu crearea și distrugerea unui embrion uman în scopul izolării transplanturilor de celule stem umane.

Problemele celulelor stem și provocările care vor trebui rezolvate

potențialul tratamentelor cu celule stem de a vindeca boli este promovat în mod nejustificat , ceea ce poate duce la un fals sentiment de optimism în rândul publicului . Numeroase studii efectuate la nivel mondial , în special în țări cu relativ puține reglementări privind tratamentele cu celule stem pentru oameni, au demonstrat probleme serioase legate de aplicațiile celulelor stem .

Încă mai avem un drum lung de parcurs până la perfecționarea tehnologiilor cu celule stem pentru tratarea pacienților . Deși aplicațiile potențiale ale celulelor stem pot părea foarte promițătoare, multe întrebări fundamentale despre aceste celule rămân fără răspuns, iar provocări semnificative trebuie abordate înainte ca tehnologiile cu celule stem să poată fi considerate opțiuni de tratament viabile și sigure . De exemplu, cum poate fi controlată diferențierea dirijată a celulelor stem *in vitro* și *in vivo* dacă celulele stem sunt introduse direct în organism ? O problemă cu injectarea celulelor stem , în loc de țesuturi adulte diferențiate , este că oamenii de știință nu pot controla pe deplin răspândirea celulelor stem în alte părți ale corpului și nici nu pot controla diferențierea celulelor stem în alte țesuturi decât cel dorit.

Celulele stem embrionare injectate în modele animale au dus la formarea de tumori , inclusiv teratoame. În alte *experimente in vivo,* Celulele diferențiate din celulele stem au generat anomalii îngrijorătoare ale numărului de cromozomi , cum ar fi trisomiile 12 și 17. Unii pacienți din clinici nereglementate de celule stem din China , Thailanda , Coreea, România și alte țări au decedat ca urmare a complicațiilor cauzate de injecțiile cu celule stem .

Alte întrebări importante care rămân fără răspuns sunt - următoarele :

- Cum se autoreînnoiesc celulele stem și cum rămân într -o stare nediferențiată ?
- Ce factori cauzează diviziunea celulelor stem ?
- Care sunt semnalele de creștere (chimice, genetice, de mediu) care influențează diferențierea celulelor stem ?
- Ce tipuri de celule stem vor fi cele mai eficiente pentru medicina regenerativă?
- Poate fi produs în mod practic orice tip de celulă stem, inclusiv iPSC-urile , pentru tratamente terapeutice pe scară largă?
- Când celulele stem se diferențiază într- un anumit tip de celulă, se poate garanta că acestea nu se vor diferenția , revenind la o stare de dezvoltare anterioară după ce au fost introduse la pacienți?
- Ce boli pot fi tratate cel mai eficient folosind tehnologii cu celule stem ?
- Care sunt cele mai bune metode de a insera celule stem eficient și în siguranță ?

Răspunsurile la aceste întrebări și la multe altele îi vor ajuta pe oamenii de știință și medicii în încercarea lor de a dezvolta aplicații bazate pe celule stem pentru tratarea bolilor umane .

Reglementări legale privind celulele stem

Deși au fost stabilite ghiduri internaționale privind utilizarea etică a celulelor stem, în prezent nu există un standard internațional care să reglementeze utilizarea acestora. În Statele Unite , FDA are reguli privind puritatea celulelor stem și aplicațiile acestora în studiile clinice și produsele medicale. La scurt timp după ce celulele stem embrionare umane (HESC) au fost izolate pentru prima dată, Comitetul Consultativ Național de Bioetică din SUA și Institutele Naționale de Sănătate (NIH) au început să lucreze la dezvoltarea de ghiduri pentru cercetarea celulelor stem embrionare umane . Pe 9 august *2001* , *președintele* George V.V. Bush a anunțat interdicția de utilizare

a fondurilor federale pentru crearea unui embrion în scopul izolării celulelor stem embrionare. Această interdicție a permis însă utilizarea fondurilor federale pentru cercetare cu 78 de linii celulare care fuseseră deja stabilite înainte de această dată și erau disponibile prin intermediul NIH. Rațiunea din spatele acestei decizii a fost că embrionii excedentari din fertilizarea *in vitro fuseseră deja utilizați* pentru a crea aceste linii celulare.

Cu toate acestea, doar 21 dintre aceste linii celulare au fost disponibile pentru cercetare, iar multe dintre ele s-au dovedit mai puțin valoroase decât se credea inițial. Unele nu au reușit să crească fără a se diferenția; altele au prezentat instabilitate genetică, cu anomalii ale numărului de cromozomi. Unele linii au fost contaminate cu celule nutritive de șoarece (care erau de obicei folosite pentru a furniza nutrienți esențiali pentru creșterea celulelor stem în primele zile ale cercetării celulelor stem). Mulți oameni de știință și grupuri de susținere a celulelor stem au făcut lobby intens pentru a anula interdicția privind finanțarea federală pentru crearea de noi linii de celule stem.

Comunitatea științifică era în general îngrijorată de faptul că interdicția privind finanțarea federală pentru cercetarea celulelor stem ar duce la o „exodă a creierelor", determinând cercetătorii de top în domeniul celulelor stem să părăsească Statele Unite în țări cu politici de cercetare a celulelor stem mai puțin restrictive. Acest lucru ar pune Statele Unite într-un dezavantaj competitiv în dezvoltarea tehnologiilor cu celule stem. Multe companii private au început să conducă cercetarea celulelor stem cu finanțare privată și, în multe cazuri, aceste companii și-au mutat departamentele de cercetare în state și țări care susțineau cel mai mult cercetarea celulelor stem.

În 2006, Senatul SUA a adoptat o moțiune pentru ridicarea interdicției privind utilizarea fondurilor federale, dar această moțiune a fost ulterior respinsă de președintele Bush. Congresul a încercat din nou în 2007 cu o moțiune care a fost, de asemenea, respinsă de președintele Bush. În martie 2009, președintele Barack Obama a emis un ordin executiv pentru ridicarea interdicției și a însărcinat NIH cu elaborarea unor linii directoare în termen de patru luni pentru a reglementa finanțarea federală pentru cercetarea celulelor stem embrionare (ESC). În aprilie 2009, NIH a publicat un proiect de linii directoare pentru a reglementa finanțarea federală pentru cercetarea ESC (dar nu și utilizarea fondurilor federale pentru obținerea ESC). În august 2010, un judecător federal din Districtul Columbia a emis o ordonanță preliminară prin care a oprit temporar ordinul președintelui Obama din 2009 de a extinde finanțarea pentru celulele stem embrionare. Această hotărâre a provocat o mare indignare în rândul cercetătorilor în domeniul celulelor stem care se bazau pe finanțarea federală pentru proiectele lor. A interzis utilizarea fondurilor federale pentru cercetarea celulelor stem, deși a permis continuarea lucrărilor finanțate cu granturi acordate anterior.

În septembrie 2010, Curtea de Apel a SUA a suspendat temporar ordonanța judecătorului respectiv, iar în decembrie, o comisie federală de apel a început să o revizuiască. Pentru a ilustra impactul acestei ordonanțe asupra companiilor americane implicate în cercetarea celulelor stem, prețurile acțiunilor acestora au scăzut cu peste 8% atunci când a fost anunțată ordonanța. NIH a fost forțat să ordone oprirea imediată a cercetărilor efectuate de cercetătorii săi care utilizează celule stem. La sfârșitul lunii aprilie 2011, Curtea de Apel a SUA a anulat ordonanța, dar cazul ar putea ajunge în cele din urmă la Curtea Supremă. Vizitați site-ul web al NIH privind celulele stem la http://stemcells.nih.gov/ pentru actualizări privind reglementările actuale, împreună cu alte resurse legate de celulele stem și utilizările acestora.

Multe fundații private oferă sute de milioane de dolari cercetătorilor din domeniul celulelor stem , iar mai multe state au adoptat legislație pentru a crea institute de cercetare a celulelor stem și a oferi finanțare de stat pentru cercetarea în acest domeniu. Printre cele mai active state se numără California (care în 2004 a adoptat Propunerea 71 cu un buget de aproape 300 de milioane de dolari în obligațiuni și peste 3 miliarde de dolari în total), New Jersey, Connecticut, Illinois, Maryland și Wisconsin. La nivel mondial, reglementările legale variază în ceea ce privește producerea de noi linii de celule stem și clonarea terapeutică. De exemplu, producerea de noi linii și clonarea terapeutică sunt legale în Regatul Unit, Israel, Coreea de Sud, China și Singapore. Clonarea terapeutică este interzisă în Brazilia, Australia și Uniunea Europeană (deși celulele stem pot fi obținute din embrioni neutilizați prin *fertilizare in vitro,* cu condiția ca acest lucru să fie legal în statul membru UE relevant).

Centre legitime de cercetare a celulelor stem au fost înființate în întreaga lume, atât în țări considerate puteri majore în cercetare, cât și în multe alte țări relativ mai mici (Belgia, Suedia, Turcia, Israel, Elveția etc.). Cu toate acestea, așa cum am menționat anterior, numeroase clinici de tratament cu celule stem au apărut în întreaga lume, atrăgând pacienți aflați în căutarea disperată a unui leac, care călătoresc din alte țări în căutarea unui fel de remediu pentru afecțiunea lor.

Aceste remedii sunt adesea promovate și vândute ca o descoperire majoră, în ciuda lipsei de date fiabile și a existenței unor efecte secundare adverse. Acești pacienți , adesea denumiți „turiști cu celule stem", călătoresc prin lume pentru tratamente cu celule stem neaprobate, iar numărul persoanelor implicate în acest tip de „turism" continuă să crească într-un ritm alarmant. Uniunea Europeană are legi similare cu cele adoptate de FDA în Statele Unite privind celulele stem. Dar este clar că trebuie stabilite legi internaționale pentru a reglementa utilizarea în siguranță a celulelor stem și a preveni frauda și cazurile tragice de aplicații necorespunzătoare și neetice ale acestor celule. O astfel de utilizare abuzivă a celulelor stem, împreună cu tragediile rezultate, nu vor face decât să încetinească progresul și să erodeze încrederea în tratamentele legitime aflate în prezent în curs de dezvoltare.

Probleme etice relative la celulele stem

Membrii diferitelor congregații religioase, politicieni , cercetători și publicul larg continuă să dezbată cu pasiune beneficiile celulelor stem. Una dintre problemele fundamentale care stau la baza acestor dezbateri este originea celulelor stem umane, în special a celulelor stem umane (HSC), și potențialele lor utilizări și abuzuri. Într-o mare măsură, HSC-urile sunt controversate din cauza originii lor - un embrion uman în stadii incipiente de dezvoltare. Știind că HSC-urile pot avea un potențial enorm pentru tratarea și vindecarea multor boli devastatoare și pentru a oferi oamenilor oportunitatea de a trăi vieți mai lungi și mai sănătoase, ce părere aveți despre utilizarea lor?

Setul de probleme etice care înconjoară celulele stem și aplicațiile lor pare să nu aibă sfârșit.

- Este acceptabilă producerea unui embrion uman cu unicul scop de a-l distruge în alte scopuri?
- Unii oameni se tem că tehnologiile de clonare și celulele stem vor crea o cerere uriașă de embrioni umani pentru cercetare. Este acceptabil să plătești femeile pentru a le fi prelevate chirurgical ovulele?
- Care este statutul moral al embrionilor aflați în prima lor - etapă de dezvoltare, creați prin clonare terapeutică?
- Ce drepturi are un donator de celule asupra liniilor de celule stem sau a tehnologiilor create din celulele pe care le -a donat?
- Ar trebui donatorii de țesuturi să împărtășească potențialul - comercial și recompensa monetară derivate din liniile de celule stem create din celulele pe care le - au donat ?

Unii oameni cred că o ființă umană se formează în momentul în care un ovul este fertilizat și , prin urmare, consideră clonarea terapeutică echivalentă cu uciderea deliberată a unui copil în beneficiul altei persoane . Alții cred că un embrion timpuriu nu este nimic mai mult decât o colecție de celule vii cu potențialul de a se dezvolta într- o persoană , dar că embrionul în sine nu este o ființă umană . În plus , cum putem justifica distrugerea embrionilor dezvoltați prin tehnici de fertilizare *in vitro ?* Este legal să folosești acei embrioni pentru a reduce durerea și suferința altor persoane ?

Oamenii de știință definesc viața în multe feluri. Biologii sunt de acord că grupul de celule numit blastocist este viu la nivel celular. Însă, deși toate formele de viață merită respect, blastocistul nu este o persoană, deoarece îi lipsesc membrele, sistemul nervos, organele sau alte caracteristici fizice ale unei ființe umane . Așadar , una dintre principalele surse de dezbatere continuă să fie dacă ar trebui să atribuim un statut moral embrionilor umani și , dacă da , în ce etapă . Crește valoarea morală a unui embrion pe măsură ce se dezvoltă ? Sau este valoarea morală a unui embrion aceeași cu cea a unui copil sau a unui adult? Dacă considerăm că un embrion timpuriu este o persoană vie , atunci acesta ar avea toate drepturile altor persoane vii. Prin urmare, distrugerea intenționată a unui embrion ar fi imorală.

Trebuie să abordăm probleme etice importante legate de persoanele care donează celule utilizate pentru obținerea de celule stem de orice fel. Cuplurile care utilizează fertilizarea in vitro pentru a avea un copil semnează formulare de consimțământ care le conferă autoritate legală asupra embrionilor creați din gameții lor după finalizarea tratamentelor de fertilitate . Recent , NIH a respins zeci de linii de celule stem care purtau mutații pentru diverse boli , deoarece agenția guvernamentală a stabilit că limbajul excesiv de vag din aceste formulare de consimțământ nu îndeplinea standardele etice așteptate pentru informarea cuplurilor donatoare cu privire la utilizările preconizate ale embrionilor lor . Multe dintre aceste linii celulare respinse fuseseră create din embrioni testați pentru defecte genetice asociate cu boli specifice folosind diagnosticul genetic preimplantațional .

Cetățenii, care sunt cei care își plătesc impozitele , ar trebui să decidă cum ar trebui cheltuiți banii lor și la ce ar trebui folosiți .

Ei consideră că este etic, responsabil și sigur să se desfășoare cercetări științifice. Diverse sondaje de opinie publică au furnizat date neconcludente cu privire la opiniile americanilor cu privire la utilizarea celulelor stem. Sondajele recente indică faptul că procentul americanilor care consideră utilizarea celulelor stem acceptabilă din punct de vedere moral a crescut treptat de la 50 la 65% în ultimii opt ani. În general, americanii se așteaptă să primească cel mai înalt nivel de asistență medicală din lume. Dacă oamenii de știință dintr-o altă țară folosesc celule stem pentru a dezvolta tratamente pentru boala Parkinson, boala Alzheimer și alte boli, cum s-ar simți cetățenii americani dacă nu ar avea acces la aceste tehnologii în propria lor țară?

Și cum rămâne cu implicațiile etice ale utilizării oricărui tip de celule stem pentru procedurile de medicină regenerativă? Unii oameni și-au exprimat opoziția față de potențiala utilizare a celulelor stem iPS, deoarece nu cred că oamenii de știință ar trebui să creeze țesuturi și organe de înlocuire.

Lecturi și resurse selectate

Articole de revistă

Cowan, CA, Atienza, J." Melton, D.A., et al. 2005. Reproducerea nucleară a celulelor somatice după fuziunea cu celule stem embrionare umane . Science , 309: 1369-1373.

De Coppi, R, Bartsch, G., Siddiqui, M. M, et al. 2007. Izolarea liniilor de celule stem amniotice cu potențial terapeutic. *Nature Biotechnology,* 25: 100-106.

Hall, SS (2011). Boli într-un vas de bucătărie. Scientific American, 304:41-45.

Hanna, JH, Saha, K. și Jaenisch, R. 2010. Pluripotența și reprogramarea celulară : fapte, ipoteze. Probleme nerezolvate. *Cell,* 143: 508-525.

Hanna. J., Wcrnig, M., Markoulaki, S. și colab. 2007. Tratamentul anemiei falciforme la șoareci cu celule iPS generate din piele autologă . *Science,* 318: 1920-1923

Hochedlinger, K. Vindecătorii tăi interiori. 2010. *Scientific American,* 302: 46-53, mai.

Meissner, A., Wernig, M. și Jaenisch, R. (2007). Reprogramarea directă a fibroblastelor nemodificate genetic în celule stem pluripotente. *Nature Biotechnology,* 25: 1 177-1181.

Pera, M. F. și Tam, PPL 2010. Reglarea extrinsecă a celulelor stem pluripotente. *Nature,* 465: 713-720.

Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S. și colab. 1998. Obținerea celulelor stem pluripotente din celule germinale primordiale umane cultivate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 95: 13726-13731.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. 2007. Inducerea celulelor stem pluripotente din fibroblaste umane adulte prin factori definiți. Ce//, 131:861-872 .

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, SS» și alții. 1998. Linii de celule stem embrionare derivate din blastociste umane. *Science,* 282: 1145-1147.

Yamanaka, S. și Blau, H. M. 2010. Reprogramarea nucleară într- o stare pluripotentă prin trei abordări . *Nature,* 465: 704-712.

Yu, J., Vodyanik, MA, Smuga-Otto, K., și colab. 2007. Linii de celule stem pluripotenti induse din celule somatice umane. *Science,* 318: 1917-1920.

Site-uri web

cu celule stem embrionare umane . Sumanas, Inc. 2007. http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/stem-cells_scnLhtml

Stem , http://www.stembook.org/

Informații despre celulele stem: Resursa Institutului Național de Sănătate pentru cercetarea celulelor stem, http://stemcells.nih.gov/

Resources.org : Știința educației, http://www.ste-mcellresources.org/

Universitatea din Michigan: Cercetare pe celule stem. http://www.umich . edu/celula stem/

Un gel de agarosa que contiene fragmentos de ADN separados, teñidos con bromuro de etidio, un colorante de unión al ADN, y visualizados con luz ultravioleta.

20

Tehnologia ADN-ului recombinante

CONCEPTE CAPITOL

►► Tehnologia ADN-ului recombinant creează combinații de secvențe de ADN din diferite surse.

►► O aplicație comună a tehnologiei ADN-ului recombinant este clonarea unui segment de ADN de interes.

►► În unele aplicații de clonare, segmente specifice de ADN sunt inserate în vectori pentru a crea molecule de ADN recombinant, care sunt apoi transferate în celule gazdă eucariote sau procariote, cum ar fi bacteriile, unde ADN-ul recombinant se replică pe măsură ce celulele gazdă se divid.

Bibliotecile de ADN sunt colecții de ADN clonat care au fost utilizate în mod tradițional pentru izolarea anumitor gene.

►► Segmentele de ADN pot fi amplificate rapid și clonate de milioane de ori folosind reacția în lanț a polimerazei (PCR).

ul , ARN-ul și proteinele pot fi analizate folosind o gamă largă de tehnici moleculare.

►► Secvențierea ADN-ului permite dezvăluirea compoziției nucleotidice a ADN-ului clonat , iar progresele rapide ale tehnologiilor de secvențiere au stimulat multe domenii ale cercetării genetice moderne, în special genomica.

Tehnologia ADN-ului recombinant a revoluționat capacitatea noastră de a investiga genomurile diferitelor specii și a condus la revoluția genomică modernă .

j—' n 1971, un articol publicat de Kathleen Danna și Daniel Nathans au marcat începutul erei ADN-ului recombinant. Acest articol descrie izolarea unei enzime dintr-o tulpină bacteriană și utilizarea acestei enzime pentru a tăia ADN-ul viral în secvențe nucleotidice specifice. Conține prima fotografie publicată a ADN-ului tăiat cu una dintre aceste enzime, numită acum enzimă de restricție.

Folosind enzime de restricție și alte resurse, cercetătorii de la mijlocul până la sfârșitul anilor 1970 au dezvoltat mai multe tehnici pentru a crea, replica și analiza molecule de ADN recombinant - ADN creat prin unirea fragmentelor de ADN din diverse surse. Metodele utilizate pentru copierea sau clonarea ADN-ului, numite acum tehnologia ADN-ului recombinant și cunoscute anterior sub numele de splicing genetic, au reprezentat un progres major în - cercetarea în biologie moleculară și genetică, permițând oamenilor de știință să izoleze și să studieze secvențe specifice de ADN. Pentru contribuțiile lor la dezvoltarea acestei tehnologii, Nathans, Hamilton Smith și Werner Arber au primit Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină în 1978 .

Puterea tehnologiei ADN-ului recombinant este incredibilă , permițând geneticienilor să identifice și să izoleze o singură genă sau un segment de ADN de interes dintr-un genom. Apoi, prin clonare, pot fi produse cantități mari de copii identice ale acelei molecule specifice de ADN . Aceste copii identice, sau clone, pot fi apoi manipulate în diverse scopuri, inclusiv investigarea structurii și organizării ADN-ului , studierea expresiei genelor și producerea de produse comerciale importante din proteina codificată de o genă. Tehnicile fundamentale utilizate în tehnologia ADN-ului recombinant au condus ulterior în domeniul genomicii , permițând oamenilor de știință să secvențieze și să analizeze genomuri întregi. Vom analiza aceste subiecte în detaliu în capitolele 21 și 22. În acest capitol, vom trece în revistă metodele de bază utilizate în tehnologia ADN-ului recombinant pentru a izola, replica și analiza ADN-ul.

20.1

Tehnologia ADN-ului recombinant a început cu două instrumente fundamentale: enzimele de restricție și vectorii de clonare a ADN-ului

Deși procesele genetice naturale, cum ar fi încrucișarea, produc molecule de ADN recombinant, termenul *de ADN recombinant* este de obicei rezervat moleculelor produse prin unirea artificială a ADN-ului obținut din diferite surse. Metodele utilizate pentru a crea aceste molecule au fost derivate din biochimia acizilor nucleici, combinate cu tehnici genetice dezvoltate pentru studiul bacteriilor și virusurilor.

Vom începe discuția noastră despre tehnologia ADN-ului recombinant prin a lua în considerare două instrumente importante utilizate pentru a construi și amplifica moleculele de ADN recombinant : enzimele de tăiere a ADN-ului, numite enzime de restricție , și vectorii de clonare a ADN-ului . Utilizarea enzimelor de restricție și a vectorilor de clonare a fost în mare măsură responsabilă pentru progresele în domeniul biologiei moleculare, datorită gamei largi de tehnici bazate pe tehnologia ADN- ului recombinant .

Enzimele de restricție taie ADN-ul la secvențe specifice de recunoaștere

Enzimele de restricție sunt produse de bacterii ca mecanism de apărare împotriva infecțiilor virale. Acestea restricționează sau previn infecția virală prin degradarea ADN-ului virusurilor invadatoare. Au fost identificate peste 3.500 de enzime de restricție , iar aproximativ 250 dintre ele sunt produse comercial și - disponibile cercetătorilor . Enzimele de restricție recunosc și se leagă de secvențe nucleotidice specifice din ADN; acest situs de legare se numește situs de restricție (Figura 20.1). Enzima taie apoi ambele catene de ADN din cadrul acelei secvențe, rupând catena fosfodiesteric a ADN -ului . Oamenii de știință se referă adesea la acest proces ca „digestia ADN-ului ". Utilitatea enzimelor de restricție pentru clonare provine din capacitatea lor de a tăia precis și reproductibil ADN-ul genomic în fragmente . Enzimele de restricție sunt un fel de foarfece moleculare sofisticate pentru tăierea ADN-ului în fragmente de dimensiunea dorită. Dimensiunea fragmentelor de restricție de ADN produse atunci când ADN-ul este digerat cu o enzimă specifică poate fi estimată din numărul de ori de câte ori enzima taie ADN - ul . Siturile de restricție sunt distribuite aleatoriu în tot genomul . Enzimele cu o secvență de recunoaștere cu patru baze — cum ar fi enzima AluI , *care* recunoaște secvența (AGCT) — ar face o secvență, în medie, la fiecare 256 de perechi de baze ($4^4 = 4^2 = 256$), dacă cele patru nucleotide sunt prezente în proporții egale , producând multe fragmente scurte. Dimensiunea reală a fragmentelor produse prin digestia ADN-ului cu o anumită enzimă de restricție este variabilă, deoarece numărul și locația secvențelor de recunoaștere nu sunt întotdeauna distribuite aleatoriu în ADN .

Majoritatea secvențelor de recunoaștere prezintă un tip de simetrie numit palindrom : secvența de nucleotide se citește la fel pe ambele catene de ADN în direcția 5' -3' .

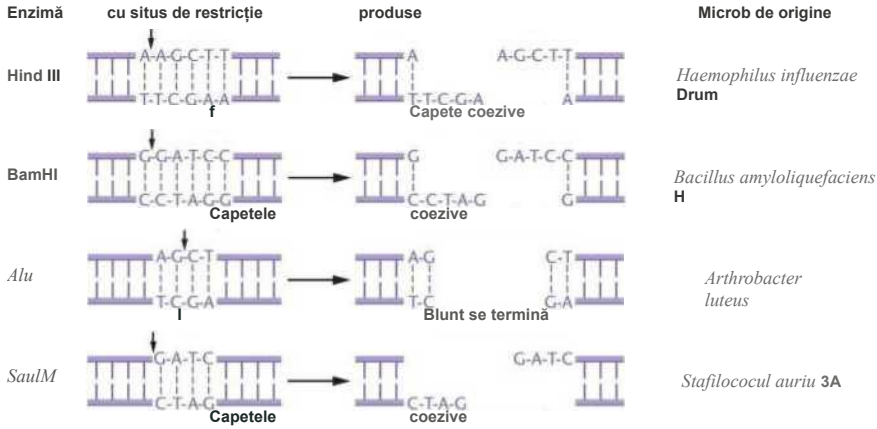


FIGURA 20.1 Enzime de restricție comune cu situsurile lor de restricție, modelele de tăiere a ADN-ului și originile. Săgețile indică poziția ADN-ului la care fiecare enzimă taie.

Fiecare enzimă de restricție își recunoaște secvența specifică de recunoaștere și taie ADN-ul conform unui model caracteristic de tăiere. Cele mai comune secvențe de recunoaștere au patru sau șase nucleotide lungime, dar unele conțin opt sau mai multe nucleotide. Enzime precum EcoRI și *HindlU* realizează tăieturi decalate în ambele catene de ADN, producând fragmente cu capete monocatenare suspendate , numite capete coezive . Alte enzime, cum ar fi *AluI* și *Bali,* taie ambele catene la aceeași pereche de nucleotide , producând fragmente de ADN cu capete dublu catenare, numite fragmente cu capete tocite. Figura 20.1 prezintă patru enzime de restricție comune, împreună cu situsurile lor de restricție și microbii lor de origine.

Una dintre primele enzime de restricție identificate a fost izolată din tulpina R de *Escherichia coli* și denumită EcoRI . Fragmentele de ADN produse prin digestie cu EcoRI (Figura 20.2) au capete coezive, numite și capete lipicioase, deoarece se pot împerechea bază cu alte capete monocatenare ale altor fragmente de ADN tăiate de EcoRI. Când sunt amestecate, capetele monocatenare ale acestor fragmente de ADN de origini diferite și tăiate cu aceeași enzimă de restricție se pot combina sau uni prin legături de hidrogen între perechile de baze complementare ale ambelor catene simple. Adăugarea enzimei ADN ligază (reamintiți rolul ADN ligazei în replicarea ADN-ului, pe care l-am explicat în Capitolul 11 ?) la - fragmentele de ADN va determina formarea coloanei fosfodiesterice a ADN-ului, astfel încât fragmentele sunt unite covalent pentru a forma molecule de ADN recombinant (Figura 20.2).

Vectorii ADN acceptă și replică moleculele de ADN pe care dorim să le clonăm.

Oamenii de știință și-au dat seama că fragmentele de ADN produse prin digestia cu enzime de restricție puteau fi copiate sau clonate dacă ar fi disponibilă o tehnică de replicare a fragmentelor . Al doilea instrument fundamental care a permis clonarea ADN-ului a fost dezvoltarea vectorilor de clonare a ADN-ului . Vectorii sunt molecule de ADN care acceptă fragmente de ADN și le replică atunci când vectorii sunt plasați în interiorul celulelor gazdă .

Mulți vectori diferiți sunt disponibili pentru clonare. Acești vectori diferă în ceea ce privește celulele gazdă în care pot fi introduși și dimensiunea inserturilor pe care le pot transporta, dar majoritatea vectorilor de ADN prezintă câteva proprietăți fundamentale comune.

- Un vector conține mai multe situsuri de restricție care permit inserarea fragmentelor de ADN care urmează să fie clonate.
- Vectorii trebuie introduși în celulele gazdă pentru a permite replicarea independentă a ADN-ului vector și a oricăror

fragmente de ADN pe care le transportă .

- Pentru a diferenția celulele gazdă care includ vectori de cele care nu includ , vectorul trebuie să poarte o genă marker selectabilă (de obicei, o genă de rezistență la antibiotice sau gena pentru o enzimă absentă din celula gazdă).
- Mulți vectori încorporează secvențe specifice care permit secvențierea ADN-ului inserat.

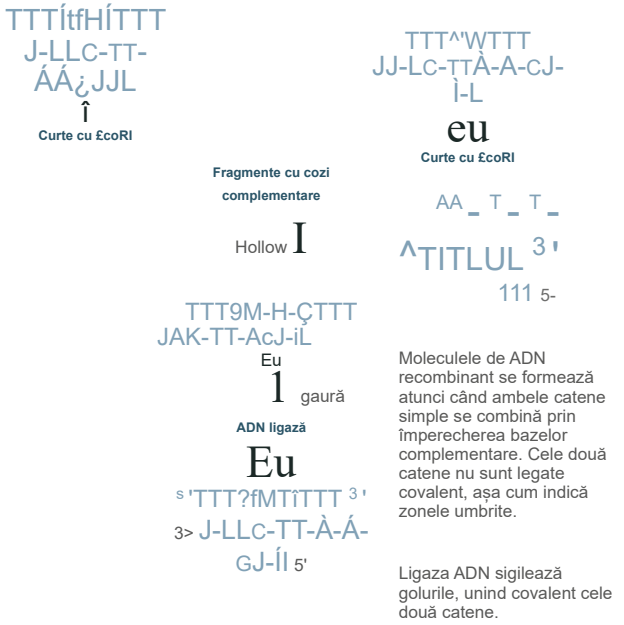

Curte cu £coRI
Fragmente cu cozi complementare
Hollow I
ADN ligază
Eu
Moleculele de ADN recombinant se formează atunci când ambele catene simple se combină prin împerecherea bazelor complementare. Cele două catene nu sunt legate covalent, așa cum indică zonele umbrite.
Ligaza ADN sigilează golurile, unind covalent cele două catene.

FIGURA 20.2 ADN-ul din diferite surse este tăiat cu Eco Rl și amestecat pentru a permite fragmentelor să se combine. Enzima ADN ligază formează legături fosfodiesterice între aceste fragmente pentru a crea o moleculă de ADN recombinant intactă.

- Vectorul și fragmentul său de ADN inserat trebuie să fie ușor izolate din celula gazdă, pentru a putea recupera ADN-ul clonat pentru diverse aplicații.

Vectori plasmidici bacterieni

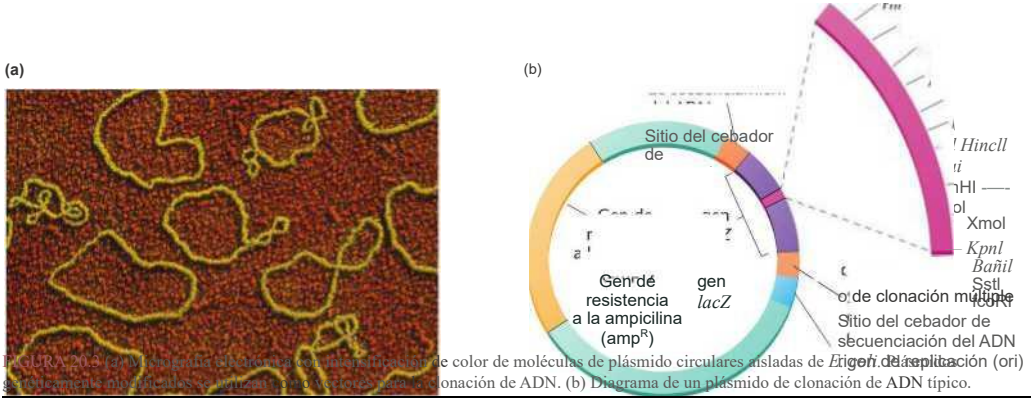


FIGURA 20.3 (a) Micrografía electrónica con falso color de moléculas de plásmido circulares aisladas de *Escherichia coli*. (b) Diagrama de un plásmido de clonación de ADN típico.

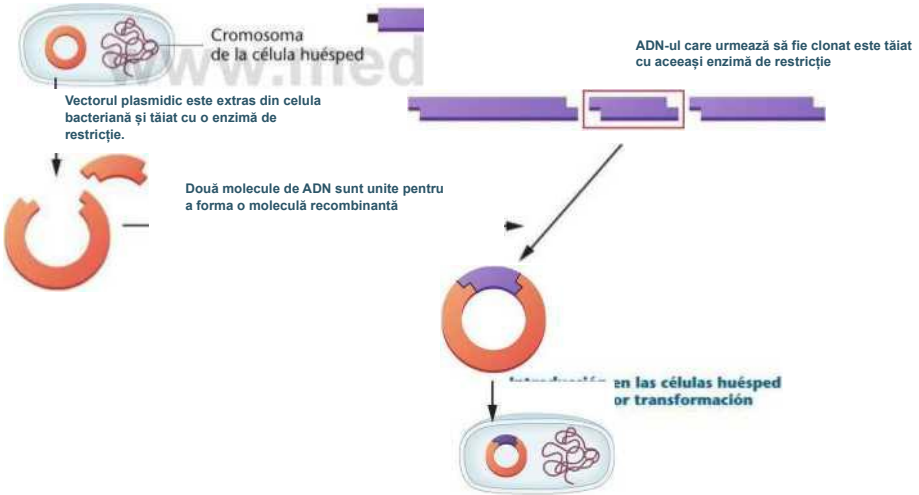
Primii vectori care au fost dezvoltați și care sunt încă utilizați pe scară largă pentru clonare au fost plasmidele

Bacterii modificate genetic. Vectorii de clonare plasmidică au fost derivați din plasmide naturale . Reamintim din Capitolul 6 că plasmidele sunt molecule de ADN extracromozomiale, bicatenare, care se replică independent de cromozomii din celulele bacteriene [Figura 20.3 (a)]. Plasmidele au fost ulterior modificate extensiv prin inginerie genetică pentru a servi drept vectori de clonare. Sunt disponibile numeroase plasmide preparate comercial cu o gamă de caracteristici utile [Figura 20.3 (b)]. Plasmidele sunt introduse în

bacterii prin procesul de transformare *(vezi* Capitolul 6). Două tehnici principale sunt utilizate pe scară largă pentru transformarea bacteriană: una implică tratarea celulelor cu ioni de calciu și utilizarea unui șoc termic scurt pentru a introduce ADN -ul în celule. Cealaltă tehnică, numită electroporare , utilizează un impuls electric scurt, de mare intensitate, pentru a introduce ADN-ul în celulele bacteriene.

De obicei, doar una sau câteva plasmide intră într-o celulă gazdă bacteriană prin transformare. Deoarece plasmidele au o origine de replicare *(ori) care permite* replicarea plasmidei , multe dintre ele își pot crește numărul de copii existente, astfel încât câteva sute de copii pot exista într-o singură celulă gazdă. Aceste plasmide cresc considerabil numărul de clone de ADN care pot fi produse. Vectorii plasmidici au fost, de asemenea, modificați genetic pentru a include diverse situsuri de restricție, corespunzătoare enzimelor de restricție utilizate în mod obișnuit; acestea sunt conținute într-o regiune numită situs de clonare multiplă. Situsurile de clonare multiple permit oamenilor de știință să cloneze o gamă de fragmente diferite generate de multe enzime de restricție utilizate în mod obișnuit.

Clonarea ADN-ului folosind o plasmidă începe de obicei prin tăierea atât a ADN-ului plasmidic, cât și a ADN-ului țintă cu aceeași enzimă de restricție (Figura 20.4). Plasmida este de obicei tăiată odată ce a intrat în interiorul situsului de clonare multiplă pentru a produce un vector liniar. Fragmentele de ADN de restricție din -ADN-ul țintă sunt adăugate la vectorul liniarizat în prezența ADN ligazei . Capetele coezive ale fragmentelor de ADN se combină , unind astfel plasmida și ADN-ul țintă. ADN ligaza este apoi utilizată pentru a crea legături fosfodiesterice pentru a umple golurile din catena ADN -ului, rezultând ADN recombinant, care este apoi introdus în celulele gazdă bacteriene prin transformare. Odată ajunși în interiorul celulei , plasmidele se replică rapid pentru a produce copii multiple.


Cromosoma
de la célula huésped
Vectorul plasmidic este extras din celula bacteriană și tăiat cu o enzimă de restricție.
ADN-ul care urmează să fie clonat este tăiat cu aceeași enzimă de restricție
Două molecule de ADN sunt unite pentru a forma o moleculă recombinantă
en las células huésped
or transformación

Celulele care conțin plasmide recombinante pot fi selectate prin însămânțarea lor într-un mediu care conține antibiotice și indicatori de culoare, cum ar fi X-gal.

FIGURA 20.4 Clonarea cu un vector plasmidic implică tăierea atât a plasmidei, cât și a ADN-ului care urmează să fie clonat cu aceeași enzimă de restricție . ADN -ul care urmează să fie clonat este tăiat și îmbinat în vector și transferat la o gazdă bacteriană pentru replicare. Celulele bacteriene

care conțin plasmide cu inserturi de ADN pot fi identificate prin selecție și apoi izolate. ADN-ul clonat este apoi recuperat din gazda bacteriană pentru analize ulterioare.

Totuși, atunci când se clonează ADN folosind plasmide, nu toate acestea vor încorpora ADN-ul care urmează să fie clonat. De exemplu, o plasmidă tăiată cu o enzimă de restricție specifică se poate închide (autoligare) dacă capetele tăiate ale plasmidei se pot recombina. Evident, astfel de plasmide nerecombinante sunt nedorite. De asemenea, în timpul transformării , nu toate celulele gazdă vor încorpora plasmidele. Prin urmare, este foarte important să se poată identifica cu ușurință , într-un experiment de clonare, celulele bacteriene care conțin ADN recombinant. O modalitate de a face acest lucru este prin utilizarea genelor marker selectabile descrise anterior. Genele care conferă rezistență la antibiotice, cum ar fi ampicilina, și gene precum *lacZ* sunt gene marker selectabile foarte eficiente. Figura 20.5 oferă un exemplu despre cum se utilizează aceste gene pentru a identifica bacteriile care conțin plasmide recombinante. Acest proces este adesea numit selecție „albastru-alb" dintr -un motiv care va deveni clar în curând. În selecția albastru-alb, o plasmidă care conține gena *lacZ este* încorporată în situsul de clonare multiplă. Gena lacZ codifică enzima β-galactozidază, care, așa cum am văzut în Capitolul 16, este utilizată pentru a scinda dizaharida lactoză în monozaharidele sale componente, glucoză și galactoză. Selecția albastru-albă profită de activitatea enzimatică a β-galactozidazei .

celulele bacteriene transformate care conțin plasmide recombinante sau nerecombinante pot fi ușor identificate . Dacă un fragment de ADN este introdus oriunde în situsul de clonare multiplă, gena *lacZ* este perturbată și nu va produce copii funcționale ale β-galactozidazei. Bacteriile transformate din acest experiment sunt plasate pe plăci de agar care conțin un antibiotic (ampicilină în acest caz). Bacteriile netransformate nu pot crește bine pe aceste plăci deoarece le lipsește gena *ampk* , iar antibioticul le va inhiba creșterea. Cu toate acestea, aceste plăci de agar conțin și o substanță numită X-gal (tehnic 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranozidă).

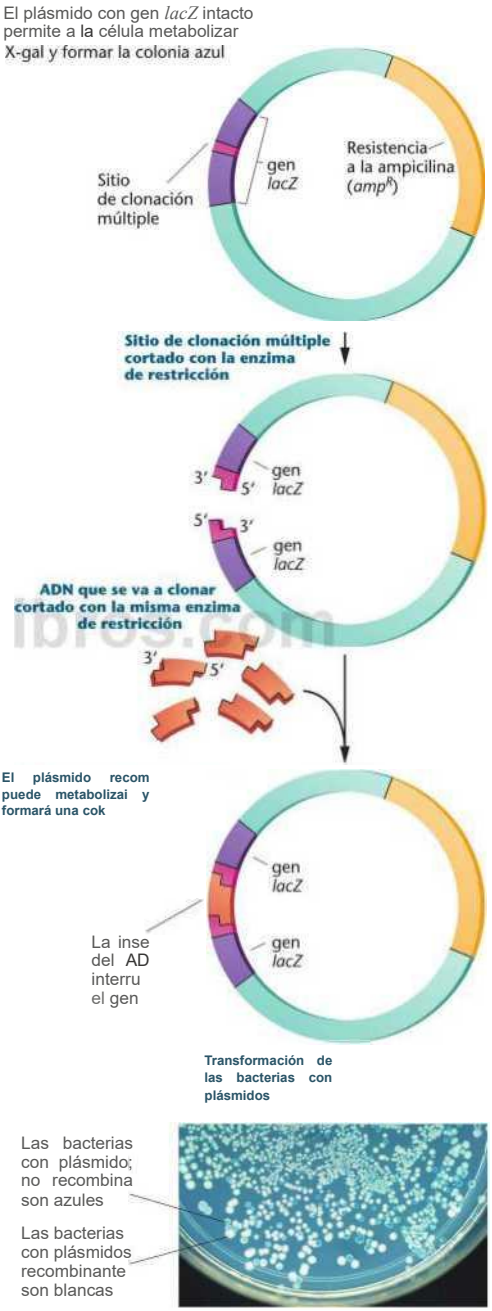

El plásmido con gen *lacZ* intacto permite a la célula metabolizar X-gal y formar la colonia azul
Sitio de clonación múltiple
gen *lacZ*
Resistencia a la ampicilina (*amp*^{R})
Sitio de clonación múltiple cortado con la enzima de restricción
3′
5′
gen *lacZ*
5′
3′
gen *lacZ*
ADN que se va a clonar cortado con la misma enzima de restricción
3′
5′
El plásmido recom puede metabolizai y formará una cok
gen *lacZ*
La inse del AD interru el gen
gen *lacZ*
Transformación de las bacterias con plásmidos
Las bacterias con plásmido; no recombina son azules
Las bacterias con plásmidos recombinante son blancas

FIGURA 20.5 În procedurile de selecție albastru-alb, ADN-ul inserat în situsul de clonare multiplă al unei plasmide interferează cu *gena lacZ,* astfel încât bacteria care conține ADN-ul recombinant nu este capabilă să metabolizeze X-gal, rezultând colonii albe care permit identificarea directă a coloniilor bacteriene care conțin inserturi de ADN clonate. Fotografie a unei plăci Petri care prezintă creșterea celulelor bacteriene după încorporarea plasmidelor recombinante. Celulele din coloniile albastre conțin vectori fără inserturi de ADN clonate, în timp ce coloniile albe conțin vectori care poartă inserturi de ADN.

Are o structură similară lactozei . Poate fi scindată de β-Lgalactozidază, iar când se întâmplă acest lucru, devine albastră. Drept urmare, celulele bacteriene care poartă plasmide nerecombinante (cele care s-au închis pe ele însele și nu conțin ADN inserat) au o genă *lacZ funcțională* și produc β-Lgalactozidază, care scindează X-gal în mediu, provocând colorarea albastră a acestor celule. Bacteriile recombinante , care conțin plasmide cu un fragment de ADN inserat , formează colonii albe în mediul X-gal, deoarece plasmidele din aceste celule nu produc β -Lgalactozidază funcțională (Figura 20.5). Bacteriile din aceste colonii albe sunt clone unele ale altora - celule identice genetic cu copii ale plasmidelor recombinante. Coloniile albe pot fi transferate în flacoane cu mediu de cultură bacterian și cultivate în cantități mari, după care este relativ ușor să se izoleze plasmide recombinante din aceste celule.

Plasmidele rămân instrumentul principal în multe aplicații ale tehnologiei ADN-ului recombinant, dar au o limitare: deoarece sunt mici, pot accepta doar inserții de ADN de până la 25 de kilobaze (kb), iar majoritatea plasmidelor acceptă doar fragmente considerabil mai scurte. Prin urmare, pe măsură ce tehnologia ADN-ului recombinant s-a dezvoltat și a apărut nevoia de a clona fragmente mari de ADN , au fost dezvoltați și alți vectori, în principal pentru capacitatea lor de a accepta fragmente de ADN mai mari și, de asemenea, pentru că pot fi utilizați cu alte tipuri de celule gazdă, nu doar cu bacterii.

Alte tipuri de vectori de clonare

Printre primii vectori utilizați în locul plasmidelor s-au numărat sistemele de vectori fagi. Acestea au inclus tulpini modificate genetic ale bacteriofagului X. Genomul fagului Z, un virus care infectează E. *coli,* a fost complet cartografiat și secvențiat, iar genomul său a fost modificat pentru a încorpora multe dintre caracteristicile importante ale vectorilor de clonare descriși anterior în acest capitol, inclusiv prezența unui situs de clonare multiplu. Vectorii fagi au fost foarte populari o perioadă de timp și sunt utilizați și astăzi, deoarece pot purta inserții de până la 45 kb lungime, mai mult decât dublul lungimii inserțiilor de ADN găsite în majoritatea vectorilor plasmidici. Fragmentele de ADN sunt ligate în vectorul fagic pentru a produce vectori Z recombinanți, care sunt apoi ambalați *in vitro* în capsidele proteice ale fagului și introduși în celule gazdă bacteriene cultivate pe vase Petri . În interiorul bacteriilor, vectorii se replică și formează multe copii ale fagului infectiv, fiecare purtând un insert de ADN. Pe măsură ce se reproduc, ele provoacă liza celulelor gazdă bacteriene, rezultând în pete numite pete cheli (descrise în Capitolul 6), din care fagii pot fi izolați, iar ADN-ul clonat recuperat ulterior.

Cromozomii artificiali bacterieni (BAC) și cromozomii artificiali de drojdie (YAC) sunt alte două exemple de vectori care pot fi utilizați pentru a clona fragmente mari de ADN. De exemplu, cartografierea și analizarea genomurilor eucariote mari, cum ar fi genomul uman, a necesitat vectori de clonare care puteau transporta fragmente de ADN foarte mari, cum ar fi segmente ale unui cromozom întreg. BAC-urile sunt, în esență, plasmide foarte mari, cu număr mic de copii (de obicei una sau două copii per celulă bacteriană), care pot accepta inserții de ADN cu lungimea cuprinsă între 100 și 300 de kilobaze. La fel ca cromozomii naturali, un YAC are telomeri la fiecare capăt, origini de replicări și un centromer. Aceste componente sunt legate de gene marker selectabile și de un set de secvențe de recunoaștere a enzimelor de restricție pentru inserarea ADN-ului străin. Cromozomii de drojdie variază în dimensiune de la 230 kb la peste 1.900 kb, permițând clonarea inserțiilor de ADN între 100 și 1.000 kb folosind cromozomi YAC. Capacitatea de a clona fragmente mari de ADN în acești vectori îi face un instrument valoros în proiectele de secvențiere genomică, inclusiv în Proiectul Genomului Uman *(vezi* Capitolul 21).

Vectorii de expresie sunt concepuți pentru a asigura expresia ARNm a unei gene clonate, cu scopul de a produce mai multe copii ale proteinei codificate de genă într-o celulă gazdă . Vectorii de expresie sunt disponibili atât pentru celulele gazdă procariote, cât și pentru cele eucariote. Pentru multe aplicații de cercetare care implică studiul structurii și funcției proteinelor, producerea unei proteine recombinante în bacterii (sau alte celule gazdă) pentru purificare ulterioară este o tehnică de rutină, deși exprimarea adecvată a unei proteine care își păstrează funcția biologică nu este întotdeauna ușoară. Industria biotehnologiei utilizează, de asemenea, pe scară largă vectorii de expresie pentru a fabrica produse proteice valoroase comercial din gene clonate, un subiect pe care îl vom discuta în Capitolul 22.

Vectori Ti pentru celulele vegetale

Introducerea genelor în speciile de plante este o aplicație destul de comună care poate fi realizată în diverse moduri, iar în Capitolul 22 vom discuta câteva aspecte ale ingineriei genetice a plantelor. O tehnică utilizată pe scară largă pentru inserarea genelor în celulele vegetale utilizează bacteria din sol *Rhizobium radiobacter,* care infectează celulele vegetale și produce tumori (numite gale) la multe specii de plante. Numită anterior

Agrobacterium tumefadens, această bacterie a fost redenumită pe baza analizei genomice. *Rhizobium* conține o plasmidă numită plasmidă Ti (plasmidă inductoră de tumori), iar formarea tumorilor este asociată cu prezența unor gene specifice pe plasmida Ti. În natură, atunci când bacteriile care poartă plasmida Ti infectează celulele plantelor, un segment al plasmidei Ti, numit *ADN-T, este transferat* în genomul celulei plantei gazdă . Genele din segmentul de ADN-T controlează formarea tumorilor și sinteza compușilor necesari pentru creșterea bacteriilor care au cauzat infecția.

Situsurile de restricție ale plasmidelor Ti pot fi utilizate pentru a insera ADN străin, introducând vectori recombinanți în *Agrobacterium* prin transformare. Genele care induc tumori din plasmidele Ti sunt îndepărtate din vector, astfel încât vectorul recombinant să nu provoace formarea de tumori. Celulele *Agrobacterium* care conțin ADN recombinant sunt amestecate cu celule vegetale (nu toate tipurile de celule vegetale pot fi infectate cu *Agrobacterium).* Odată ajuns în interiorul celulei , ADN- ul străin este inserat în genomul plantei atunci când ADN-ul T se integrează într -un cromozom al celulei gazdă. Celulele vegetale care poartă o plasmidă Ti recombinantă pot fi cultivate în culturi de țesuturi. Prezența anumitor compuși în celulele vegetale din mediul de cultură stimulează formarea rădăcinilor și a lăstarilor , rezultând în cele din urmă o plantă matură purtătoare a unei gene străine.

Celule gazdă pentru vectori de clonare Pe lângă decizia privind vectorul de clonare , o altă considerație privind clonarea care merită explicată este selecția celulelor gazdă care să accepte ADN-ul recombinant pentru clonare. Există multe motive diferite pentru alegerea anumitor celule gazdă pentru un experiment cu ADN recombinant , în funcție de obiectivele proiectului. În timp ce *E. coli* este utilizată pe scară largă ca celulă gazdă procariotă atunci când se lucrează cu plasmide, drojdia *Saccharomyces cerevisiae* Este utilizată în mod obișnuit ca celulă gazdă pentru clonarea și exprimarea genelor eucariote . Există două motive pentru aceasta: (1) Deși drojdia dură este un organism eucariot, ea poate fi cultivată și manipulată într-un mod destul de similar cu celulele bacteriene . (2) Genetica drojdiei a fost studiată pe larg , oferind un catalog mare de mutanți și o hartă genetică destul de bine dezvoltată (înainte de finalizarea secvențierii drojdiei) . (3) Întregul genom al drojdiei a fost deja secvențiat, iar genele acestui organism au fost identificate. (4) Pentru a studia funcția unor proteine eucariote, este necesar să se utilizeze o celulă gazdă care poate modifica proteina - de exemplu, prin adăugarea de carbohidrați - după ce a fost sintetizată, pentru a o converti într-o formă funcțională (bacteriile nu pot efectua unele dintre aceste modificări). (5) Drojdia a fost utilizată timp de secole în fabricarea pâinii și a berii și este considerată un organism sigur pentru producerea de proteine pentru vaccinuri și agenți terapeutici.

Selecția celulelor gazdă cuprinde și alte tipuri de celule, inclusiv celule de insecte. Diverse tipuri de celule umane pot fi cultivate și utilizate pentru a exprima gene și proteine. Aceste linii celulare pot fi apoi supuse unor diverse tehnici funcționale de analiză a genelor sau proteinelor, inclusiv teste pentru a testa eficacitatea medicamentelor în blocarea sau influențarea expresiei unei proteine recombinante specifice, în special dacă liniile celulare corespund unei boli umane, cum ar fi cancerul.

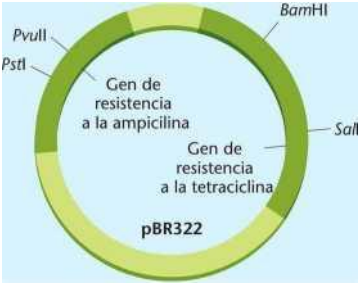
ACUM REZOLVĂ ASTA

20.1 O plasmidă rezistentă la ampicilină și tetraciclină, pBR322, este scindată cu Psd, care taie în interiorul genei de rezistență la ampicilină. Plasmida scindată este ligată cu ADN *de Drosophila* digerat folosind PstI pentru a prepara o bibliotecă genomică, iar amestecul este utilizat pentru a transforma *E. coli* K12.

(a) Ce antibiotic ar trebui adăugat în mediu pentru a selecta - celulele care au încorporat plasmida?

(b) Dacă celulele recombinante sunt însămânțate într-un mediu care conține fie ampicilină, fie tetraciclină și într-un mediu care conține ambele antibiotice, în ce plăci v-ați aștepta să observați creșterea bacteriilor care conțin plasmide cu inserturi de ADN de Drosophila *?*

(c) Cum poate fi explicată prezența coloniilor rezistente la ambele antibiotice?



■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea utilizării genelor marker selectabile de antibiotice în plasmide și mecanismul de selecție a ADN-ului antibiotic pentru identificarea bacteriilor transformate cu ADN plasmidic recombinant. Cheia rezolvării acesteia constă în realizarea faptului că inserarea ADN-ului străin în vectorul plasmidic distruge una dintre genele de rezistență la antibiotice ale plasmidei*

20.2

Bibliotecile de ADN sunt colecții de secvențe clonate

Când ADN-ul este clonat în vectori, și în special în plasmide, se produc doar segmente relativ mici de ADN , reprezentând o singură genă sau chiar o parte a unei gene. Deși câteva sute de gene pot fi introduse în vectori mai mari, cum ar fi BAC-urile sau YAC-urile, este totuși necesar să se utilizeze o metodă pentru a identifica fragmentele de ADN care au fost clonate. Să luăm în considerare acest lucru astfel: în discuția noastră de până acum despre tehnicile de clonare , am descris *modul în care* ADN-ul poate fi inserat în vectori și clonat - un proces relativ simplu - dar nu am explicat cum să știm ce secvență specifică de ADN a fost clonată. Simpla tăiere a ADN-ului și inserarea acestuia în vectori nu ne spune ce gene sau secvențe au fost clonate.

În primele decenii ale clonării ADN-ului, oamenii de știință au creat biblioteci de ADN, care reprezintă o colecție de mostre de ADN clonate derivate dintr-o singură sursă, care poate fi un anumit tip de țesut, un tip de celulă sau un individ. În funcție de modul în care este construită o bibliotecă, aceasta poate conține atât gene, cât și regiuni de ADN necodificatoare. În general, există două tipuri principale de biblioteci: biblioteci de ADN genomic și biblioteci de ADN complementar (ADNc).

Biblioteci de gene genomice

În mod ideal, o bibliotecă de genomi constă din mai multe - fragmente suprapuse ale genomului, cu cel puțin o copie a fiecărei secvențe de ADN prezentă în genomul unui organism , cuprinzând colectiv întregul genom. Pentru a crea o bibliotecă de genomi, ADN-ul este extras din celule sau țesuturi, tăiat cu enzime de restricție, iar fragmentele rezultate sunt inserate în vectori folosind tehnicile descrise în secțiunea anterioară. Deoarece unii vectori (cum ar fi plasmidele) pot transporta doar câteva mii de perechi de baze de ADN inserat , unul dintre cele mai importante aspecte este selectarea vectorului astfel încât biblioteca să conțină genomul complet în cât mai puține clone posibile . Deoarece ADN-ul genomic este ADN -ul străin introdus în vectori , bibliotecile de genomi conțin atât segmente codificatoare, cât și necodificatoare, cum ar fi intronii .

Atunci când se lucrează cu genomuri mari, cum ar fi genomul uman, alegerea vectorului este una dintre principalele decizii la crearea unor astfel de biblioteci. Prin urmare, vectorii YAC au fost utilizați pentru a se adapta dimensiunilor mari ale fragmentelor de ADN necesare pentru a acoperi cele aproximativ 3 miliarde de perechi de baze de ADN care alcătuiesc genomul uman. De exemplu, dacă am construi o bibliotecă de genom uman folosind vectori plasmidici cu inserții cu o dimensiune medie de 5 kb, am avea nevoie de peste 2,4 milioane de clone pentru a avea o probabilitate de 99 % de a recupera orice secvență din genom. Având în vedere dimensiunea sa, această bibliotecă ar fi dificil de utilizat eficient. Cu toate acestea, dacă biblioteca ar fi construită cu un vector YAC cu o dimensiune medie a inserției de 1 Mb , biblioteca ar conține doar aproximativ 14.000 de YAC-uri, ceea ce o face relativ ușor de analizat. Vectorii cu o capacitate mare de clonare, cum ar fi YAC-urile, au fost o parte esențială a Proiectului Genomului Uman.

După cum vom vedea în Capitolul 21, tehnicile de clonare a - genomurilor întregi din fragmente alese aleatoriu *(vezi* Figura 21.1) și noile metodologii de secvențiere (numite secvențiere de generație următoare) înlocuiesc rapid bibliotecile tradiționale de ADN genomic, deoarece permit secvențierea tuturor fragmentelor de ADN dintr-o probă de ADN genomic fără a fi nevoie să se insereze aceste fragmente în vectori și să se cloneze în celulele gazdă. În Capitolul 21 , vom vedea, de asemenea, cum analiza secvenței de ADN folosind bioinformatica ne permite să identificăm secvențele care codifică proteinele și cele necodificatoare în ADN-ul clonat.

Biblioteci de gene ADN complementar (ADNc)

Bibliotecile de ADN complementar (ADNc) oferă anumite avantaje față de bibliotecile genomice și rămân o metodologie deosebit de utilă pentru clonarea genelor . Acest lucru se datorează în principal faptului că o bibliotecă de ADNc conține copii de ADN - numite ADNc - derivate din moleculele de ARNm ale unei populații celulare și, prin urmare, reprezintă genele care erau exprimate în celule în momentul creării bibliotecii. ADNc este complementar secvenței de nucleotide a ARNm și, prin urmare, spre deosebire de o bibliotecă genomică care conține tot ADN-ul unui genom - atât secvențe care codifică genele , cât și secvențe care nu codifică - o bibliotecă de ADNc conține doar genele exprimate. Drept urmare, bibliotecile de ADNc s-au dovedit deosebit de utile pentru identificarea și studierea genelor exprimate în celule sau țesuturi specifice în anumite condiții, de exemplu, în timpul dezvoltării, morții celulare, cancerului sau altor procese biologice. Aceste biblioteci de gene pot fi, de asemenea, utilizate pentru a compara genele exprimate în țesuturile normale și în țesuturile afectate de boli. De exemplu, această tehnică a fost

deosebit de utilă în identificarea genelor implicate în dezvoltarea cancerului , cum ar fi genele care contribuie la procesul de transformare a unei celule normale într-o celulă canceroasă, precum și genele implicate în metastaza (răspândirea) celulelor canceroase.

O bibliotecă de ADNc este preparată prin izolarea ARNm dintr-o populație celulară. De obicei, sunt selectate celulele care exprimă abundent ARNm-ul corespunzător genelor pe care dorim să le clonăm . Practic, tot ARNm-ul izolat din celulele eucariote are un lanț de adenine la capătul 3' numit coada poli-A (reamintim acest lucru din Capitolul 13) și putem profita de această caracteristică structurală a ARNm-ului. Următorul pas în crearea unei biblioteci de ADNc este amestecarea ARNm-urilor cu primeri oligo (dT) - secvențe monocatenare de nucleotide T care hibridizează cu coada poli-A (Figura 20.6). Enzima transcriptază inversă extinde primerul oligo (dT) și sintetizează o copie complementară a secvenței de ARNm . Produsul acestei reacții este o moleculă hibridă ARNm-ADN bicatenară . ARN-ul din molecula hibridă poate fi digerat enzimatic sau degradat chimic , după care o a doua catenă de ADN , complementară primei, poate fi sintetizată de ADN polimerază . În timp, tot ARN-ul din moleculele hibride este înlocuit de ADN, creând molecule de ADNc bicatenar care sunt complementare ARNm-ului. Alternativ , ADNc poate fi sintetizat și folosind primeri care se leagă aleatoriu de ARNm și de prima catenă de ADNc, creând în cele din urmă un ADNc bicatenar din catena de ARNm originală .

Moleculele de ADNc sunt apoi inserate în vectori, de obicei plasmide. Deoarece de obicei nu știm ce enzime de restricție ar putea fi utilizate pentru a tăia acest ADN, atunci când se introduce ADNc într-o plasmidă , este adesea necesar să se atașeze secvențe linker la capetele *ADNc* - ului. Secvențele linker sunt oligonucleotide scurte , dublu catenare , care conțin o secvență de recunoaștere pentru o enzimă de restricție (de exemplu , EcoRI). După atașarea la ADNc, secvențele linker sunt tăiate de EcoRI și ligate în vectori tratați cu aceeași enzimă. Pentru a construi o bibliotecă de ADNc , vectorii care transportă molecule de ADNc sunt transferați în celulele gazdă , urmați de clonare.

Aceste biblioteci de gene oferă o imagine de ansamblu asupra genelor care au fost active transcripțional într-un țesut la un moment dat, deoarece cantitatea relativă de ADNc dintr-o anumită bibliotecă este echivalentă cu cantitatea de ARNm inițial izolat din țesut și utilizat pentru a forma biblioteca . Sunt disponibile multe biblioteci diferite de ADNc , obținute din celule și țesuturi în stadii specifice de dezvoltare și din diferite organe , cum ar fi creierul .

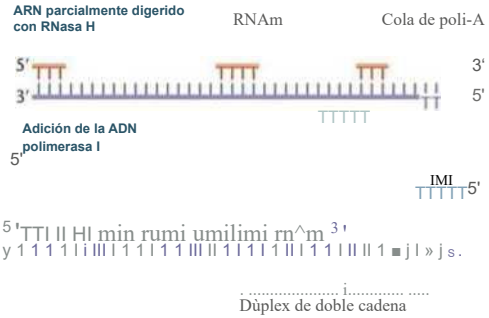

ARN parcialmente digerido con RNasa H
RNAm
Cola de poli-A
Adición de la ADN polimerasa I
IMI
Dùplex de doble cadena
Adăugarea de ADN ligază pentru a sigila golurile

FIGURA 20.6 Producerea de ADNc din ARNm. Deoarece multe ARNm eucariote au o coadă poli-A de lungime variabilă la un capăt, o moleculă oligo(dT) scurtă hibridizată cu această coadă servește ca primer pentru enzima transcriptază inversă. Transcriptaza inversă utilizează ARNm ca șablon pentru a sintetiza o catenă de ADN complementară (ADNc), formând un duplex ARNm/ADNc dublu catenar. ARNm este digerat cu enzima RNază H, producând lacune în catena de ARN. Capetele 3' ale ARN-ului rămas servesc ca primeri pentru ADN polimeraza I, care sintetizează o a doua catenă de ADN. Rezultatul este o moleculă de ADNc dublu catenar care poate fi clonată într-un vector adecvat sau utilizată direct ca sondă pentru a examina o bibliotecă de gene.

includ gene provenite din mușchi și rinichi, precum și din țesuturi corespunzătoare diferitelor stadii ale unei boli, cum ar fi cancerul. Aceste biblioteci genetice oferă un catalog instantaneu al tuturor

genelor active dintr-o celulă la un moment dat și s-au dovedit a fi instrumente neprețuite pentru oamenii de știință, în ceea ce privește izolarea și studierea genelor prezente în țesuturi specifice.

Este posibilă recuperarea unor gene specifice dintr-o bibliotecă de gene prin screening

Bibliotecile genomice și de ADNc sunt de obicei compuse din câteva sute de mii de clone de ADN diferite, similar modului în care o bibliotecă publică mare ar putea conține multe cărți, dintre care doar unele sunt relevante pentru studiile noastre genetice. Așadar, cum putem utiliza bibliotecile de gene pentru a localiza o anumită genă de interes? Pentru a găsi o anumită genă, trebuie să identificăm și să izolăm doar clona sau clonele care o conțin. De asemenea, trebuie să determinăm dacă o anumită clonă conține întreaga genă pe care o studiem sau doar o parte din ea . Mai multe metode ne permit să analizăm biblioteca de gene și să izolăm genele specifice de interes, un proces numit screening al bibliotecilor. Alegerea metodei depinde de obicei de circumstanțe și de informațiile pe care le avem despre gena pe care o căutăm.

Sondele sunt adesea folosite pentru a examina o bibliotecă de gene și a recupera clone corespunzătoare unei gene specifice. O sondă este o secvență de ADN sau ARN complementară unei părți a unei secvențe clonate prezente în bibliotecă - gena sau secvența țintă pe care dorim să o identificăm. O sondă este, de asemenea, marcată sau etichetată în diverse moduri, astfel încât să poată fi identificată. Atunci când este utilizată într-o reacție de hibridizare, sonda se leagă de orice secvență de ADN complementară prezentă într-una sau mai multe clone. Sondele pot fi marcate cu izotopi radioactivi sau, din ce în ce mai mult, cu compuși neradioactivi care suferă reacții chimice sau de schimbare a culorii pentru a indica locația unei clone specifice într-o bibliotecă de gene.

Sondele pot proveni din diverse surse. Chiar și gene înrudite izolate de la alte specii pot fi utilizate dacă se păstrează o porțiune suficientă a secvenței de ADN . De exemplu, genele clonate la șobolani, șoareci sau chiar *la Drosophila* , în care similaritatea secvenței cu genele umane a fost păstrată, au fost utilizate ca sonde pentru a identifica gene umane în timpul screening-ului bibliotecilor de gene.

Pentru a examina o bibliotecă bacteriană cu o sondă, clonele bacteriene ale bibliotecii sunt cultivate pe plăci de agar nutritiv , unde formează sute sau mii de colonii (Figura 20.7). O replică a coloniilor fiecărei culturi este realizată prin presarea ușoară a unei membrane de nailon sau nitroceluloză pe suprafața plăcii; aceasta transferă modelul coloniilor bacteriene de pe placă pe membrană. Membrana este apoi procesată pentru a liza celulele bacteriene. ADN - ul bicatenar eliberat de celule este apoi denaturat pentru a obține catene simple, care sunt ulterior atașate la membrană.

ADN-ul membranar este urmărit prin incubarea acestuia cu o sondă de acid nucleic marcată. Mai întâi, sonda este încălzită și apoi răcită rapid pentru a forma molecule monocatenare, apoi sonda este adăugată la o soluție care conține membrana. Dacă secvența de nucleotide a oricăruia dintre ADN -urile membranare este complementară sondei, se va forma o moleculă hibridă ADN -ADN bicatenar (o catenă de la sondă și cealaltă de la ADN-ul clonat prezent în membrană) . Această etapă se numește hibridizare.

După incubarea sondei și a membranei, moleculele sondă nelegate în exces sunt spălate , iar membrana este analizată pentru a depista orice molecule hibride rămase . Dacă s-a utilizat o sondă radioactivă , membrana este acoperită cu un film cu raze X. Radioactivitatea moleculelor sondă legate de ADN-ul din membrană va determina apariția unor pete întunecate pe film după developare . Aceste pete reprezintă coloniile de pe placă care conțin gena clonată de interes (Figura 20.7). Folosind poziția petelor de pe film ca ghid, coloniile corespunzătoare sunt identificate și recuperate de pe placă. ADN -ul clonat pe care îl conțin poate fi apoi utilizat în experimente ulterioare . În cazul unor sonde non-radioactive, o reacție chimică emite fotoni de lumină (chemiluminescență) care expun filmul fotografic și dezvăluie locația coloniilor care poartă gena de interes.

am explicat aici, bibliotecile de gene permit oamenilor de știință să cloneze ADN și apoi să identifice genele individuale prezente în bibliotecă. Clonarea ADN-ului din bibliotecile de gene rămâne o - tehnică cu aplicații foarte interesante . Cu toate acestea , așa cum vom vedea în Capitolul 21, metodele de bază ale tehnologiei ADN-ului recombinant au oferit fundamentul pentru dezvoltarea unor tehnici puternice de secvențiere și clonare a genomurilor întregi , ducând la nașterea erei genomice în domeniul biologiei moleculare și geneticii moderne . Din ce în ce mai mult , tehnicile genomice care secvențiază genomuri întregi fără a fi nevoie să se creeze biblioteci de gene înlocuiesc multe tehnici tradiționale de ADN recombinant care anterior clonau sau identificau doar gene individuale sau câteva gene odată .

ACUM REZOLVĂ ASTA

20.2 Pentru întrebarea 20.16, ni se pune la dispoziție o bibliotecă de ADNc cu gene umane preparate într-un vector plasmidic bacterian. De asemenea, ni se oferă secvența de ADN genomic clonată corespunzătoare genei de drojdie care codifică EF -1α , o proteină extrem de conservată printre organismele eucariote. Indicați cum am putea utiliza aceste resurse pentru a identifica clona de ADNc uman care codifică EF - 1α .

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să folosim o bibliotecă de ADNc pentru a izola gena EF-1 umană , atunci când avem acces la gena EF- 1 de drojdie . Cheia rezolvării acestei probleme este să ne amintim că clonele de ADNc nu au toate secvențele unei biblioteci genomice, dar conțin secvențele codificatoare (exonii) și pot fi identificate folosind sonda corespunzătoare.*

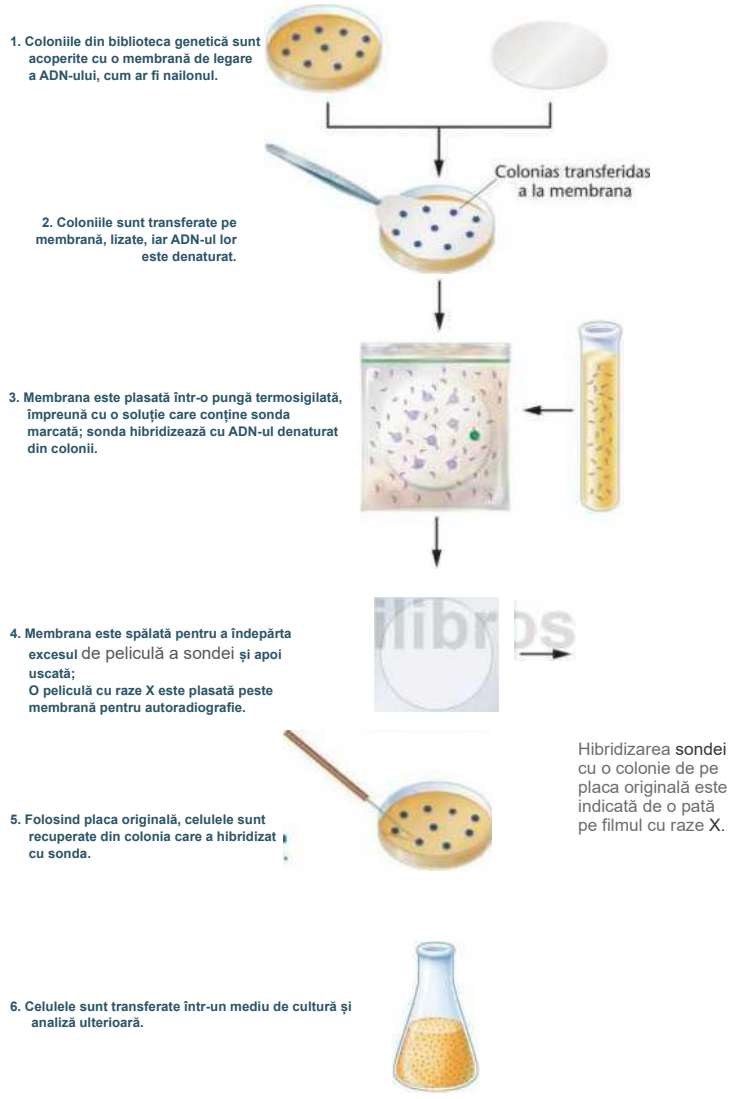

1. Coloniile din biblioteca genetică sunt acoperite cu o membrană de legare a ADN-ului, cum ar fi nailonul.
Colonias transferidas a la membrana
2. Coloniile sunt transferate pe membrană, lizate, iar ADN-ul lor este denaturat.
3. Membrana este plasată într-o pungă termosigilată, împreună cu o soluție care conține sonda marcată; sonda hibridizează cu ADN-ul denaturat din colonii.
4. Membrana este spălată pentru a îndepărta excesul de peliculă a sondei și apoi uscată;
O peliculă cu raze X este plasată peste membrană pentru autoradiografie.
Hibridizarea sondei cu o colonie de pe placa originală este indicată de o pată pe filmul cu raze X.
5. Folosind placa originală, celulele sunt recuperate din colonia care a hibridizat cu sonda.
6. Celulele sunt transferate într-un mediu de cultură și analiză ulterioară.

FIGURA 20.7 Screening-ul unei biblioteci genetice construite folosind un vector plasmidic pentru a recupera o genă specifică . Biblioteca , prezentă în bacteriile de pe plăci Petri, este acoperită cu o membrană de legare a ADN-ului , iar coloniile sunt transferate pe membrană. Coloniile de pe membrană sunt lizate, iar ADN-ul este denaturat pentru a obține catene simple. Membrana este plasată într - o pungă de hibridizare , împreună cu un tampon și o sondă de ADN monocatenară marcată . În timpul incubării , sonda formează un hibrid dublu catenar cu secvențele complementare prezente pe membrană. Membrana este scoasă din pungă și spălată pentru a îndepărta excesul de sondă . Hibrizii sunt detectați prin plasarea unei bucăți de film cu raze X peste membrană și expunerea acesteia pentru o perioadă scurtă de timp . Filmul este developat , iar evenimentele de hibridizare sunt vizualizate ca pete pe acesta. Coloniile care conțin insertul care s-a hibridizat cu sonda sunt identificate din orientarea petelor. Celulele sunt recuperate din aceste colonii pentru cultivare și pentru analize ulterioare.

20.3

Reacția în lanț a polimerazei este o tehnică puternică de copiere a ADN-ului

După cum vom vedea în Capitolul 22, tehnicile de ADN recombinant dezvoltate la începutul anilor 1970 au dat naștere industriei biotehnologice, deoarece aceste metode le-au permis oamenilor de știință să cloneze gene umane, cum ar fi gena insulinei, ale căror produse proteice puteau fi utilizate în scopuri terapeutice. Cu toate acestea, clonarea ADN-ului folosind vectori și celule gazdă necesită multă muncă și mult timp. În 1986, a fost dezvoltată o altă tehnică, numită reacția în lanț a polimerazei (PCR). Acest progres a revoluționat din nou metodologia ADN recombinant și a accelerat și mai mult ritmul cercetării în biologie. Importanța acestei metode a fost evidențiată prin acordarea Premiului Nobel pentru Chimie în 1993 lui Kary Mullis, care a dezvoltat această tehnică.

PCR este o metodă rapidă de clonare a ADN-ului care crește potențialul cercetării ADN-ului recombinant și, în multe cazuri, elimină necesitatea celulelor gazdă pentru clonare. Deși tehnicile de clonare a bibliotecilor de gene au încă aplicații specifice valoroase, PCR este metoda preferată în multe domenii, inclusiv biologia moleculară, genetica umană, evoluție, dezvoltare, conservare și criminalistică.

secvențe specifice de ADN printr- o serie de *reacții in vitro,* reacția PCR poate amplifica secvențele de ADN prezente inițial în cantități foarte mici pentru a obține o populație de molecule de ADN. Atunci când se utilizează PCR pentru clonarea ADN-ului, ADN-ul țintă dublu catenar care urmează să fie clonat este plasat într-un tub care conține ADN polimerază, Mg (un cofactor important pentru ADN polimerază) și cei patru dezoxiribonucleozide trifosfați. În plus, ca o condiție prealabilă pentru PCR , sunt necesare unele informații despre secvența nucleotidică a ADN-ului țintă . Aceste informații despre secvență sunt utilizate pentru a sintetiza doi primeri oligonucleotidici: secvențe scurte de ADN monocatenar (de obicei de aproximativ 20 de nucleotide lungime), unul complementar capătului 5' al unei catene a ADN-ului țintă care urmează să fie amplificat și celălalt complementar capătului 3' al catenei opuse. Când sunt adăugați la o probă de ADN dublu catenar care a fost denaturată pentru a obține catene simple, primerii se leagă de nucleotidele complementare care flanchează secvența care urmează să fie clonată. ADN polimeraza poate apoi extinde capătul 3' al fiecărui primer pentru a sintetiza o a doua catenă de ADN țintă. Astfel , fiecare proces complet de reacție, numit ciclu, dublează numărul de molecule de ADN prezente în reacție (Figura 20.8). Repetarea foarte rapidă a procesului produce un număr mare de copii de ADN. Dacă se dorește, produsele reacției PCR pot fi clonate în vectori plasmidici pentru utilizare în experimente ulterioare.

Cantitatea de ADN amplificat produsă este limitată teoretic doar de numărul de repetări ale acestor cicluri, deși mai mulți factori împiedică reacțiile PCR să amplifice segmente foarte lungi de ADN sau să amplifice ADN-ul la nesfârșit. Majoritatea aplicațiilor PCR de rutină implică o serie de trei etape per ciclu de reacție , care sunt următoarele :

1. Denaturare. ADN-ul bicatenar care urmează să fie clonat *este denaturat* pentru a obține catene simple . ADN -ul poate proveni din mai multe surse, inclusiv ADN genomic, rămășițe mumificate, fosile sau probe criminalistice, cum ar fi sânge uscat sau sperma, fire de păr izolate sau probe uscate obținute din dosare medicale. Încălzirea la 92–95 °C timp de aproximativ un minut denaturează ADN-ul bicatenar , rezultând catenele simple.
2. Hibridizare. Temperatura de reacție este redusă între 45 °C și 65 °C, ceea ce determină legarea primerului , numită și hibridizare , la ADN-ul monocatenar denaturat. Așa cum s-a descris anterior, primerii sunt oligonucleotide scurte - complementare secvențelor care flanchează ADN -ul țintă . Primerii servesc ca punct de plecare pentru ADN polimerază pentru a sintetiza noi catene de ADN complementare ADN - ului țintă . Factori precum lungimea primerului, compoziția bazelor primerului (primerii bogați în GC sunt mai stabili termic decât primerii bogați în AT) și dacă toate bazele dintr - un primer sunt complementare bazelor din secvența țintă sau dacă toate sau nu toate bazele dintr -un primer sunt complementare bazelor din secvența țintă sunt câteva dintre principalele considerații de care trebuie să se țină cont atunci când se selectează temperatura de hibridizare pentru un experiment .
3. Extensie. Temperatura de reacție este ajustată între 65 °C și 75 °C, iar ADN polimeraza folosește primerii ca punct de plecare pentru a sintetiza noi catene de ADN, adăugând nucleotide la capetele primerilor în direcția 5' către 3'.

PCR este o reacție în lanț deoarece numărul de noi catene de ADN se dublează în fiecare ciclu , iar noile catene, împreună cu cele vechi, servesc drept șabloane pentru

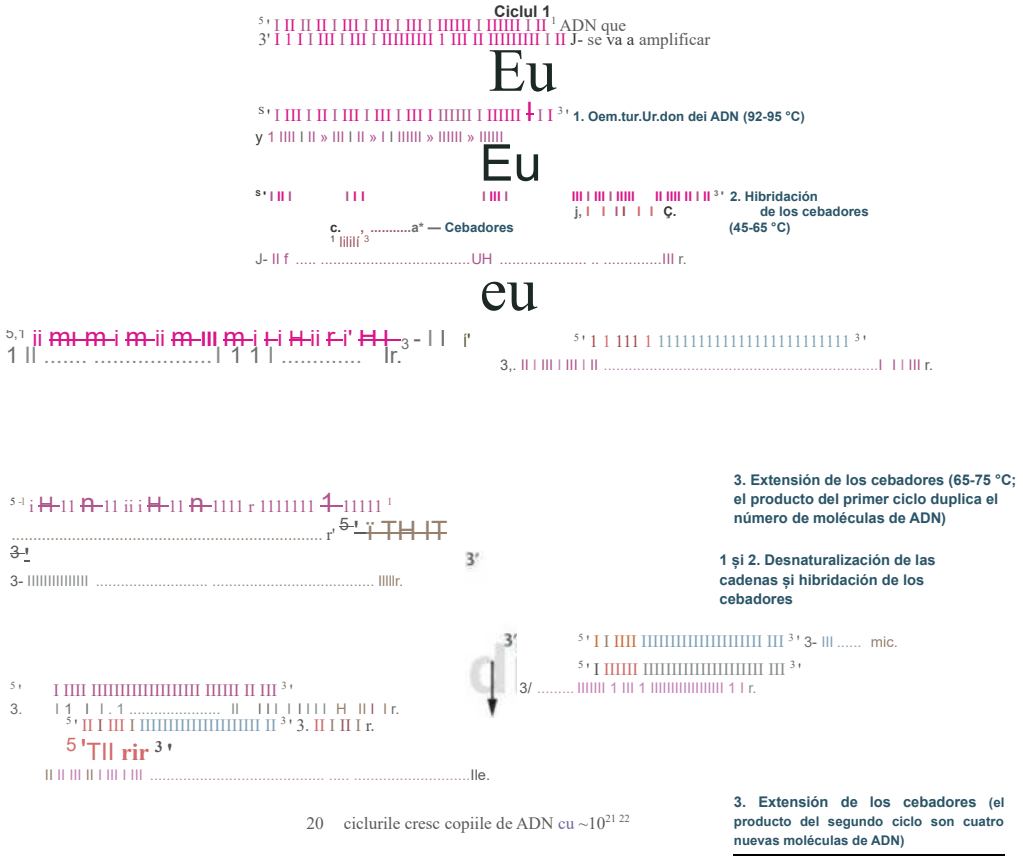

Ciclul 1
ADN que se va a amplificar
Eu
1. Oem.tur.Ur.don dei ADN (92-95 °C)
Eu
2. Hibridación de los cebadores (45-65 °C)
c. — Cebadores
eu
3. Extensión de los cebadores (65-75 °C; el producto del primer ciclo duplica el número de moléculas de ADN)
1 şi 2. Desnaturalización de las cadenas şi hibridación de los cebadores
3. Extensión de los cebadores (el producto del segundo ciclo son cuatro nuevas moléculas de ADN)
20 ciclurile cresc copiile de ADN cu ~10

FIGURA 20.8 În reacția în lanț a polimerazei (PCR), ADN-ul țintă este denaturat în catene simple; apoi, fiecare catenă este hibridizată cu primeri scurți, complementari. ADN polimeraza extinde primerii în direcția 5' către 3', utilizând ADN-ul monocatenar ca șablon . Rezultatul, după un ciclu de replicare, este o duplicare a moleculelor de ADN, creând două molecule de ADN dublu catenare nou sintetizate. Ciclurile PCR repetate pot amplifica rapid secvența originală de ADN, înmulțind numărul de molecule de peste un milion de ori . Notă : Amplificarea unei secvențe de ADN relativ scurte este prezentată aici ; în mod normal, pentru PCR se utilizează segmente de ADN mult mai lungi , iar primerii se leagă de un situs din cadrul moleculei de ADN, mai degrabă decât atât de aproape de capătul moleculei propriu-zise.

ciclul următor. Fiecare ciclu durează între 2 și 5 minute și poate fi repetat imediat, astfel încât în mai puțin de 3 ore se pot efectua 25 până la 30 de cicluri, rezultând o creștere de un milion de ori a cantității de ADN (Figura 20.8). Acest proces este automatizat folosind instrumente numite *termocide sau,* pur și simplu , aparate CPR, care pot fi programate să efectueze un număr predeterminat de cicluri. Ca rezultat, se generează cantități mari dintr-o secvență specifică de ADN, care poate fi utilizată în mai multe scopuri, inclusiv clonarea în vectori plasmidici, secvențierea ADN-ului , diagnosticul clinic și screening-ul genetic.

O cerință cheie pentru PCR este tipul de ADN polimerază utilizat în reacțiile PCR. Efectuarea mai multor cicluri PCR implică încălzirea și răcirea repetată a probelor , ceea ce duce în cele din urmă la denaturarea termică și pierderea activității pentru

SAU

majoritatea proteinelor . Reacțiile PCR se bazează pe

formes termostabile de ADN polimerază care pot rezista la cicluri multiple de încălzire și răcire fără o pierdere semnificativă a activității. PCR a devenit un instrument vital atunci când ADN polimeraza a fost izolată de *Thermus aquaticus,* o bacterie care trăiește în izvoarele termale din Parcul Național Yellowstone . Numită *Taq polimerază,* această enzimă poate tolera schimbări extreme de temperatură și a fost prima polimerază termostabilă utilizată pentru PCR.

Clonarea ADN-ului bazată pe PCR are mai multe avantaje *față de* tehnicile de clonare bazate pe biblioteci . PCR este rapid și poate fi efectuat în câteva ore, în loc de câteva zile necesare pentru a construi și urmări o bibliotecă de ADN. PCR este, de asemenea, foarte sensibil, permițând amplificarea unor secvențe specifice de ADN din probe de ADN excepțional de mici, inclusiv ADN-ul conținut într-o singură celulă. Această caracteristică a PCR este de o importanță enormă în multe tipuri de aplicații, inclusiv testarea genetică, genetica criminalistică și paleontologia moleculară. Cu primeri atent concepuți, este posibil să se recupereze și să se amplifice probe de ADN care au fost parțial degradate, contaminate cu alte materiale sau încorporate într-o matrice (cum ar fi - chihlimbarul) - toate situații în care clonarea convențională ar fi dificilă sau imposibilă. Există o mare varietate de tehnici bazate pe PCR care implică diferite variante ale tehnicii de bază descrise aici. Câteva variante utilizate în mod obișnuit sunt prezentate mai jos .

Limitările PCR-ului

Deși PCR este o tehnică foarte valoroasă, ea are și limitările sale: sunt necesare anumite informații despre secvența nucleotidică a ADN-ului țintă pentru a sintetiza primerii . În plus, chiar și o contaminare minoră a probei cu ADN din alte surse poate cauza - probleme. De exemplu, celulele care se elimină de pe pielea unui cercetător pot contamina probele colectate de la locul unei crime sau prelevate dintr -o fosilă, ceea ce face dificilă obținerea unor rezultate precise. Reacțiile PCR trebuie întotdeauna efectuate în paralel cu controale adecvate, atent concepute. În plus, PCR nu este de obicei capabilă să amplifice segmente de ADN deosebit de lungi . De obicei, ADN polimeraza dintr-o reacție PCR extinde primerii doar pe distanțe relativ scurte, în loc să continue procesarea pentru a ajunge la celălalt capăt al unei catene lungi de ADN șablon. Din cauza acestei caracteristici, oamenii de știință folosesc de obicei PCR doar pentru a amplifica fragmente de ADN care au o lungime de câteva mii de nucleotide , ceea ce este mai mult decât suficient pentru majoritatea aplicațiilor comune .

ACUM REZOLVĂ ASTA

20.3 **Problema 20.28 ne cere să calculăm temperatura de hibridizare a unui primer într-un experiment PCR. Pentru a face acest lucru, este necesar să luăm în considerare %GC al primerului . Pe baza a ceea ce știm despre perechile de baze complementare, de ce depinde - temperatura de hibridizare de %AT și %GC ale unui primer?**

■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea relației dintre temperatura de hibridizare într- o reacție PCR și compoziția nucleotidică a primerilor PCR. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a ceea ce știm despre aranjamentul legăturilor de hidrogen în perechile de baze complementare din ADN.*

Aplicații ale PCR

Clonarea ADN-ului folosind PCR a fost una dintre cele mai utilizate tehnici în genetică și biologie moleculară de peste 20 de ani. PCR și variantele sale au, de asemenea, multe alte aplicații. Simplu spus , PCR este una dintre cele mai versatile tehnici din genetica modernă. După cum vom vedea în Capitolul 22, primerii specifici genei oferă o modalitate de a utiliza PCR pentru a urmări mutațiile implicate în tulburări genetice , permițând determinarea rapidă a locației și naturii unei mutații. Primerii pot fi concepuți pentru a distinge între secvențele țintă care diferă doar cu un singur nucleotid. Acest lucru face fezabilă sintetizarea de sonde specifice alelelor pentru testarea genetică; astfel, PCR este o tehnică crucială pentru diagnosticarea tulburărilor genetice. PCR este, de asemenea, o tehnologie fundamentală de diagnostic pentru detectarea bacteriilor și virusurilor (cum ar fi hepatita sau HIV) la oameni, precum și pentru detectarea bacteriilor patogene, cum ar fi *E. coli.* și *Staphylococcus aureus* în alimentele contaminate .

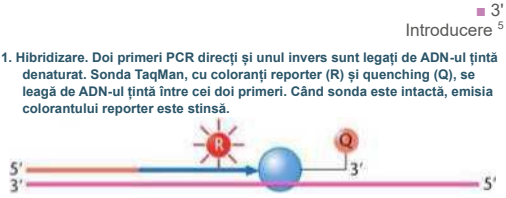
Tehnicile PCR sunt deosebit de avantajoase atunci când se studiază probe de celule izolate, fosile sau scene ale crimei, unde un singur fir de păr sau chiar un timbru poștal umezit cu salivă poate fi sursa de ADN. În capitolul special dedicat geneticii criminalistice (pagina 544), am discutat deja despre modul în care PCR este utilizat în identificarea indivizilor, inclusiv identificarea rămășițelor umane și în aplicații criminalistice. Folosind PCR, cercetătorii pot explora, de asemenea, regiuni necaracterizate ale ADN-ului adiacente regiunilor cunoscute și pot chiar secvența ADN-ul. PCR a fost utilizat pentru a impune interdicția mondială privind vânzarea anumitor produse derivate din balene și pentru a soluționa disputele privind pedigree-ul câinilor de rasă pură.

Una dintre metodele PCR utilizate în mod obișnuit se numește PCR cu transcripție inversă (RT-PCR). RT-PCR este o metodologie puternică pentru studierea expresiei genelor, adică a producției de ARNm de către celule sau țesuturi. În RT-PCR, ARN-ul este izolat din celulele sau țesuturile care urmează să fie studiate ,

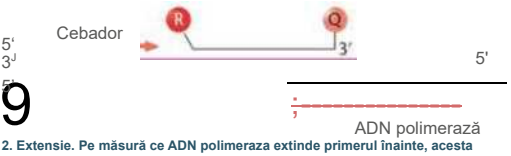
iar transcriptaza inversă este utilizată pentru a genera molecule de ADNc dublu catenar, așa cum s-a descris anterior în secțiunea despre prepararea bibliotecilor de ADNc. În această reacție, PCR este utilizat pentru a amplifica ADNc-ul, utilizând un set de primeri specifici genei de interes. Fragmentele de ADNc amplificate sunt apoi separate pe un gel de agaroză. Deoarece cantitatea de ADNc amplificată într-o reacție RT-PCR se bazează pe numărul relativ de molecule de ARNm prezente în reacția inițială, RT-PCR poate fi utilizată pentru a evalua nivelurile relative de expresie genică în diferite probe. ADNc-ul amplificat poate fi inserat în vectori plasmidici care se replică pentru a produce o bibliotecă de ADNc. RT-PCR este o tehnică mai sensibilă decât prepararea convențională a ADNc și este, de asemenea, un instrument puternic pentru identificarea moleculelor de ARNm din care sunt prezente doar una sau două copii per celulă.

În cele din urmă, în ceea ce privește tehnicile PCR, una dintre cele mai valoroase tehnici PCR moderne utilizează o metodă numită PCR cantitativă în timp real (qPCR) sau , pur și simplu, PCR în timp real. Această tehnică permite determinarea cantității de produs PCR obținut în timpul unui experiment, oferind cercetătorilor posibilitatea de a cuantifica reacțiile de amplificare pe măsură ce acestea au loc „în timp real" (Figura 20.9). Există mai multe modalități de a efectua experimente qPCR, dar procedura de bază implică utilizarea unor termocicloare specializate (și foarte scumpe) care utilizează un laser pentru a mătură un fascicul de lumină în sus și în jos pe fiecare tub PCR . Tubul de reacție conține o sondă cu un colorant sau un colorant care leagă ADN-ul și care emite lumină fluorescentă atunci când este iluminat de laser. Lumina emisă de acești coloranți se corelează cu cantitatea de produs PCR amplificată. Lumina din fiecare tub este captată de un detector, care transmite informațiile către un computer pentru a determina cantitatea de fluorescență după fiecare ciclu și numărul precis de molecule prezente în proba originală.

tehnici qPCR utilizate în mod obișnuit implică utilizarea unui colorant numit SYBR Green împreună cu sonde TaqMan. SYBR Green este un colorant care se leagă de ADN-ul bicatenar . Pe măsură ce se copiază mai mult ADN bicatenar cu fiecare rundă de PCR în timp real, există mai multe copii de ADN de care se poate lega SYBR Green, crescând cantitatea de lumină fluorescentă emisă. Sondele TaqMan sunt complementare regiunilor specifice ale ADN-ului țintă, situate între situsurile de legare ale primerilor forward și reverse utilizați pentru PCR (Figura 20.9). Sondele TaqMan conțin doi coloranți. Unul, colorantul reporter, este situat la capătul 5' al sondei și poate emite lumină fluorescentă atunci când este excitat de un fascicul laser de la termociclator. Celălalt ...



1. Hibridizare. Doi primeri PCR direcți și unul invers sunt legați de ADN-ul țintă denaturat. Sonda TaqMan, cu coloranți reporter (R) și quenching (Q), se leagă de ADN-ul țintă între cei doi primeri. Când sonda este intactă, emisia colorantului reporter este stinsă.



2. Extensie. Pe măsură ce ADN polimeraza extinde primerul înainte, acesta ajunge la sonda TaqMan și desprinde colorantul reporter de pe sondă. Eliberat din extinctor, colorantul reporter poate acum emite lumină atunci când este excitat de un laser.

3. Detectare. Lumina emisă de colorantul reporter este detectată și interpretată, pentru a obține un grafic care cuantifică cantitatea de produs PCR generat în fiecare ciclu.

FIGURA 20.9 Metoda TaqMan pentru efectuarea PCR cantitativă în timp real (qPCR) implică utilizarea unei perechi de primeri PCR, împreună cu o secvență sondă complementară genei țintă. Sonda conține un colorant reporter *(* R) la un capăt și un colorant quencher *(R) la celălalt.* Q) la celălalt capăt. Când colorantul de stingere se află în apropierea reporterului, acesta interferează cu fluorescența generată de acesta. Când ADN polimeraza *Taq* extinde un primer pentru a sintetiza o catenă de ADN, aceasta taie colorantul reporter de la sondă, permițând reporterului să emită energie. (b) Fiecare ciclu PCR ulterior elimină mai mulți coloranți reporter, astfel încât cantitatea crescândă de lumină emisă de colorant să poată fi captată de un computer pentru a obține datele privind intensitatea fluorescenței pentru fiecare ciclu.

extinctor , este atașat la capătul 3' al sondei. Când acești doi coloranți sunt apropiați, extinctorul interferează cu lumina fluorescentă emisă de reporter. Cu toate acestea, pe măsură ce ADN polimeraza Taq extinde fiecare primer, îndepărtează colorantul reporter din...

ACUM REZOLVĂ ASTA

20.4 Problema 20.14 se referă la crearea unei biblioteci de ADN genomic pentru okapi african. Dacă ați fi prima persoană din lume care a încercat să utilizeze PCR pentru a amplifica gene specifice din această bibliotecă, ce strategii ați putea folosi pentru a proiecta primeri PCR pentru experimentele dumneavoastră, având în vedere că genomul okapi nu a fost încă secvențiat?

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să proiectăm primeri PCR pentru a amplifica gena fi-globinei corespunzătoare unei specii al cărei genom tocmai l-am secvențiat. Cheia rezolvării este să ne amintim că avem date de secvență pentru gena fi-globinei umane și să luăm în considerare faptul că experimentele PCR necesită utilizarea de primeri care se leagă de baze complementare din ADN-ul care urmează să fie amplificat.*

capătul sondei (și ulterior îndepărtează întreaga sondă). Acum, că colorantul reporter este separat de stingător, lumina fluorescentă emisă de reporter poate fi detectată de termociclator. Un computer analizează lumina detectată pentru a genera un grafic care arată - cantitatea de fluorescență emisă în fiecare ciclu. Deoarece PCR în timp real nu implică utilizarea de geluri, este o tehnică rapidă și puternică pentru măsurarea și cuantificarea modificărilor în expresia genelor, în special atunci când se analizează mai multe probe și gene diferite.

20.4

Tehnici moleculare pentru analiza ADN-ului

Identificarea genelor și a altor secvențe de ADN prin clonare sau PCR joacă un rol crucial în analiza funcției și structurii genomice . Pe lângă metodele de clonare și PCR , o gamă largă de tehnici moleculare sunt disponibile geneticienilor , biologilor moleculari și practic oricui efectuează cercetări asupra ADN-ului și ARN-ului, în special celor care studiază structura, expresia și reglarea genelor. În secțiunile următoare , vom analiza unele dintre cele mai frecvent utilizate metode moleculare, care oferă informații despre organizarea și funcția secvențelor clonate . În secțiunile ulterioare , vom discuta aceste tehnici și altele în contextul aplicațiilor specifice ale geneticii moderne.

Maparea restricțiilor

Din punct de vedere istoric, unul dintre primii pași în caracterizarea unei clone de ADN a fost construirea unei hărți de restricție. O hartă de restricție stabilește numărul , ordinea și distanțele dintre situsurile de tăiere ale enzimelor de restricție dintr-un segment de ADN clonat, oferind astfel informații despre lungimea insertului clonat și locația situsurilor de tăiere ale enzimelor de restricție în cadrul clonei. Datele furnizate de aceste hărți pot fi utilizate pentru a reclona fragmente ale unei gene sau pentru a compara organizarea sa internă cu cea a altor secvențe clonate.

Înainte ca secvențierea ADN-ului și bioinformatica să devină populare, hărțile de restricție erau create experimental prin tăierea ADN-ului cu diferite enzime de restricție și separarea fragmentelor de ADN folosind electroforeza în gel, o metodă care permite separarea fragmentelor în funcție de dimensiunea lor, deoarece fragmentele mai mici parcurg o distanță mai mare prin gel (*vezi* Capitolul 10 și Figura 10.20). Fragmentele formează o serie de benzi care pot fi vizualizate prin colorarea ADN-ului cu bromură de etidiu și iluminarea acestuia cu lumină ultravioletă (Figura 20.10). Modelul rezultat al tăieturilor fragmentelor poate fi apoi interpretat pentru a determina locația situsurilor de restricție corespunzătoare diferitelor enzime.

secvențierea ADN-ului și utilizării bioinformaticii, majoritatea hărților de restricție sunt acum generate pur și simplu prin utilizarea unui software pentru a identifica situsurile de tăiere ale enzimelor de restricție în ADN-ul secvențiat . Exercițiul *de explorare genomică* din acest capitol se referă la un site web, Webcutter, care este utilizat în mod obișnuit pentru generarea de hărți de restricție .

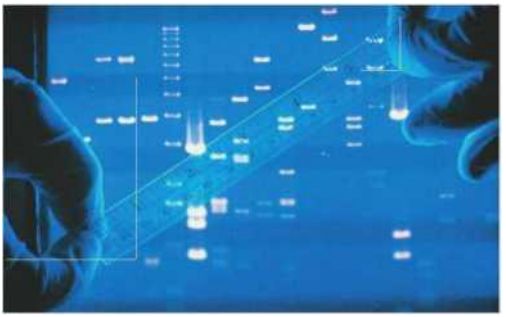


FIGURA 20.10 Un gel de agaroză conținând fragmente AON separate , colorate cu un colorant care leagă ADN-ul (bromură de etidiu) și vizualizate prin iluminare ultravioletă . Fragmentele mai mici migrează mai rapid și mai departe decât cele mari , rezultând distribuția prezentată . Tehnicile moleculare care utilizează electroforeza pe gel de agaroză sunt utilizate în mod curent într -o gamă largă de aplicații .

Acestea au reprezentat o modalitate importantă de a caracteriza ADN-ul clonat și au putut fi construite în absența oricăror alte informații despre ADN , inclusiv dacă acesta codifica sau nu o genă sau avea alte funcții.

Digestia prin restricție a clonelor (adică tăierea clonelor cu enzime de restricție) poate juca în continuare un rol important în localizarea genelor pe cromozomi umani specifici și în regiuni definite ale cromozomilor individuali. În plus, dacă un situs de restricție este situat în apropierea unei alele mutante, acest situs poate fi utilizat ca marker în testele genetice pentru a identifica purtătorii de tulburări moștenite recesiv sau pentru a efectua diagnosticul prenatal al genotipului fetal. Vom discuta acest subiect în Capitolul 22.

Hibridizarea acidului nucleic

Mai multe dintre tehnicile descrise în acest capitol se bazează pe hibridizarea între molecule complementare de acid nucleic (ADN sau ARN). Una dintre cele mai utilizate metode pentru detectarea unor astfel de hibrizi se numește Southern blot (numită după inventatorul său, Edward Southern). Metoda Southern blot *poate* fi utilizată pentru a identifica ce clone dintr-o bibliotecă de gene conțin o secvență specifică de ADN (cum ar fi ADN-ul ribozomal, o genă a β-globinei etc.) și pentru a caracteriza dimensiunea fragmentelor . Southern blot-urile pot fi, de asemenea, utilizate pentru a identifica fragmente care conțin gene specifice în cadrul ADN-ului genomic digerat de o enzimă de restricție. Fragmentele de clone genomice izolate prin Southern blot pot fi, la rândul lor, izolate și clonate din nou, oferind o modalitate de a izola părți ale unei gene. Southern blot-urile s-au dovedit, de asemenea, a fi un instrument valoros pentru identificarea numărului de copii ale unei anumite secvențe sau gene dintr-un genom.

Hibridizarea Southern blot are două componente: separarea fragmentelor de ADN prin electroforeză în gel și hibridizarea fragmentelor folosind sonde marcate. Electroforeza în gel poate fi utilizată, așa cum s-a arătat anterior, pentru a caracteriza numărul de fragmente produse prin digestie restrictivă și pentru a estima greutățile lor moleculare. Cu toate acestea, digestia cu enzime de restricție a genomurilor mari - cum ar fi genomul uman cu peste 3 miliarde de nucleotide - produce atât de multe fragmente distincte încât acestea s-ar suprapune într-un gel, producând o bandă continuă. Identificarea fragmentelor specifice în aceste cazuri se efectuează în etapa următoare: hibridizarea permite caracterizarea secvențelor de ADN prezente în fragmente. ADN-ul care urmează să fie caracterizat prin hibridizare Southern blot poate proveni din diverse surse, inclusiv ADN genomic sau clone selectate dintr-o bibliotecă de gene.

hibridizarea Southern , ADN-ul este de obicei tăiat în fragmente folosind una sau mai multe enzime de restricție , iar aceste fragmente sunt separate prin electroforeză pe gel (Figura 20.11). Ocazional, dacă se analizează fragmente mici de ADN (de exemplu, ADN plasmidic) , se poate utiliza ADN nedigerat pentru hibridizarea Southern. Ca pregătire pentru hibridizare , ADN-ul din gel este denaturat prin tratament alcalin pentru a obține fragmente monocatenare . Gelul este apoi acoperit cu o membrană de legare a ADN-ului, de obicei fabricată din nailon. Transferul fragmentelor de ADN pe membrană se realizează prin plasarea membranei și a gelului pe un suport (de obicei un burete) imersat într-o soluție tampon. Mai multe straturi de hârtie absorbantă sunt plasate deasupra membranei, iar o greutate este plasată deasupra pentru a menține contactul . Acțiunea capilară trage soluția prin gel , transferând fragmentele de ADN pe membrană.

Membrana este apoi plasată într-o pungă termosigilată , împreună cu o sondă de ADN monocatenar marcată, pentru a permite hibridizarea . Timp de mulți ani, hibridizarea Southern blot a fost efectuată în principal folosind sonde marcate radioactiv , dar, așa cum s-a menționat în discuția despre tehnicile de screening ale bibliotecilor, acum se utilizează în mod curent sonde cu marcaje fluorescente sau chemiluminiscente. Fragmentele de ADN din membrană care sunt complementare secvenței de nucleotide a - sondei se leagă de aceasta pentru a forma hibrizi dublu catenari. Excesul de sondă este apoi spălat , iar fragmentele hibridizate sunt vizualizate pe o bucată de film (Figurile 20.11 și 20.12).

Pentru a obține Figura 20.12, cercetătorii au tăiat probe de ADN genomic cu mai multe enzime de restricție . Modelul fragmentelor obținut pentru fiecare enzimă de restricție este prezentat în Figura 20.12 (a). Figura 20.12(b) ilustrează o hibridizare Southern blot a acestui gel. Sonda s-a hibridizat cu secvențele complementare , identificând astfel fragmentele de interes.

Hibridizarea Southern a condus la dezvoltarea altor tehnici similare. Hibridizarea cu ARN a fost denumită ulterior analiză de hibridizare Northern sau, pur și simplu, hibridizare Northern și, urmând o schemă de denumire derivată din direcționalitatea unei busole, o altă tehnică de hibridizare înrudită pentru detectarea - proteinelor este cunoscută sub numele de hibridizare Western . Hibridizarea Western este o tehnică utilizată pe scară largă pentru analiza proteinelor. Astfel , o parte a importanței istorice a hibridizării Southern constă în faptul că a condus la dezvoltarea altor metode de hibridizare foarte importante , care sunt acum instrumente cheie pentru studierea acizilor nucleici și a proteinelor.

Pentru a determina dacă o genă este exprimată activ într-un anumit tip de celulă sau țesut , se poate utiliza

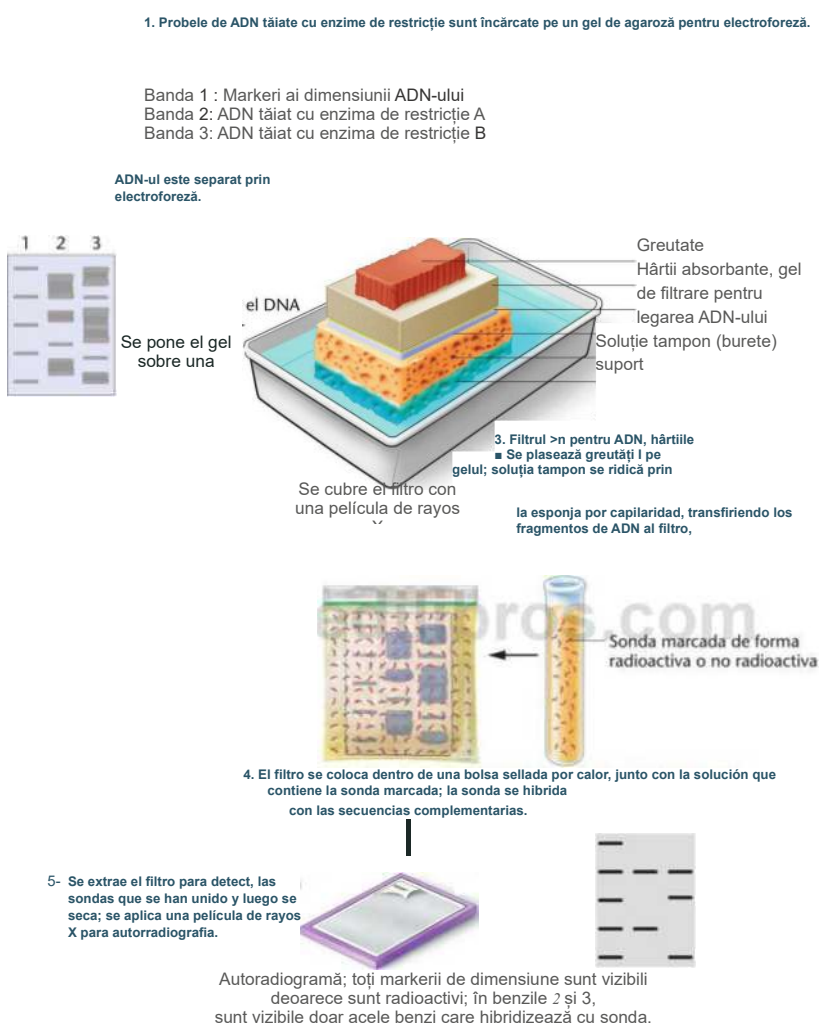

1. Probele de ADN tăiate cu enzime de restricție sunt încărcate pe un gel de agaroză pentru electroforeză.
Banda 1 : Markeri ai dimensiunii ADN-ului
Banda 2: ADN tăiat cu enzima de restricție A
Banda 3: ADN tăiat cu enzima de restricție B
ADN-ul este separat prin electroforeză.
1 2 3
Se pone el gel sobre una
el DNA
Greutate
Hârtii absorbante, gel
de filtrare pentru
legarea ADN-ului
Soluție tampon (burete)
suport
3. Filtrul >n pentru ADN, hârtiile ■ Se plasează greutăți l pe gelul; soluția tampon se ridică prin
Se cubre el filtro con una película de rayos
la esponja por capilaridad, transfiriendo los fragmentos de ADN al filtro,
Sonda marcada de forma radioactiva o no radioactiva
4. El filtro se coloca dentro de una bolsa sellada por calor, junto con la solución que contiene la sonda marcada; la sonda se hibrida con las secuencias complementarias.
5- Se extrae el filtro para detect, las sondas que se han unido y luego se seca; se aplica una película de rayos X para autorradiografía.
Autoradiogramă; toți markerii de dimensiune sunt vizibili deoarece sunt radioactivi; în benzile 2 și 3, sunt vizibile doar acele benzi care hibridizează cu sonda.

FIGURA 20.11 În tehnica de hibridizare Southern , probele de ADN care urmează să fie analizate sunt tăiate folosind enzime de restricție , iar fragmentele sunt separate prin electroforeză pe gel. Modelul fragmentelor este vizualizat *și fotografiat prin iluminarea acestuia cu lumină ultravioletă* . Gelul este apoi plasat pe un suport de burete *în* contact cu o soluție de lampă și acoperit cu o membrană de legare a ADN-ului. Mai multe straturi de hârtie absorbantă sunt plasate deasupra filtrului și ținute apăsate cu o greutate. Acțiunea capilară trage soluția prin gel , transferând modelul fragmentelor de ADN de pe gel la membrană. Fragmentele de ADN de pe membrană sunt apoi denaturate în catene simple și hibridizate cu o sondă de ADN marcată. Membrana este spălată pentru a îndepărta excesul de sondă și acoperită cu o bucată de film cu raze X pentru autoradiografie. Fragmentele hibridizate apar ca benzi pe filmul cu raze X.

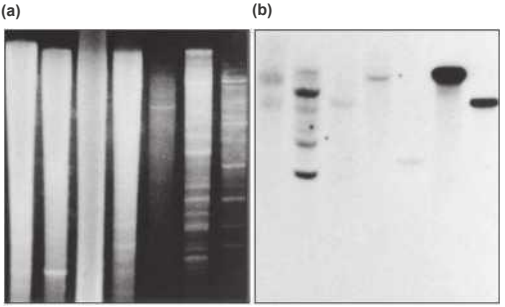


FIGURA 20.12 (a) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para mostrar los fragmentos de ADN. (b) Película de rayos X expuesta, correspondiente a una hibridación Southern preparada a partir del gel de la parte (a). Solo aquellas bandas que contienen secuencias de ADN complementarias a la sonda muestran hibridación.

Sondele de hibridizare Northern sunt utilizate pentru a detecta prezența ARNm-urilor complementare unei gene clonate (Figura 20.13). Pentru a face acest lucru, ARNm-ul este extras dintr-un anumit tip de celulă sau țesut și separat prin electroforeză în

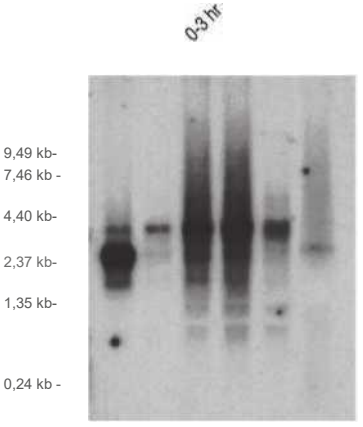


FIGURA 20.13 Analiza hibridizării Northern a expresiei genei *dfmrl* în ovarele și embrionii de *Drosophila*. În ovare și embrioni de la *0* la 3 ore de viață există un transcript dfmrl de 2,8 kilobaze (kb). Transcriptul *dfmrl* atinge abundența maximă între 9 și 12 ore de dezvoltare embrionară, când măsoară 4,0 kb. Aceste date sugerează că expresia genei *dfmrl* Poate fi reglată la nivelurile de transcripție sau de procesare a transcrierilor în timpul embriogenezei. Gena *dfmrl* este un omolog al genei *FMR1 umane* . Mutațiile cu pierdere de funcție ale *FMR1* duc la dizabilitate intelectuală asociată cu X fragil la om.

Modelul de benzi ARN rezultat este transferat pe o membrană, ca în hibridizarea Southern. Membrana este apoi reunită cu o sondă ADN monocatenară marcată dintr-o copie clonată a genei. Dacă există ARNm complementar sondei ADN, secvențele complementare se vor hibridiza și vor apărea ca o bandă pe film. Hibridizările Northern oferă informații despre expresia unor gene specifice și sunt utilizate pentru a studia modelele de expresie genică în țesuturile embrionare, cancer și tulburări genetice . Northern blot-urile permit, de asemenea, detectarea moleculelor de ARNm cu splicing alternativ (mai multe tipuri de transcrieri derivate din aceeași genă) și oferă alte informații despre ARNm-urile transcrise. Dacă se utilizează markeri ARN de dimensiune cunoscută ca martori, Northern blot-urile pot fi utilizate pentru a măsura dimensiunea transcrierilor de ARNm corespunzătoare unei gene. Măsurarea densității benzilor oferă o estimare a activității transcripționale relative a genei. Prin urmare, Northern blot-urile permit caracterizarea și cuantificarea activității transcripționale a genelor în diferite celule, țesuturi și organisme. Northern blot-urile sunt încă utilizate pentru a studia expresia ARN-ului , dar deoarece tehnicile bazate pe PCR sunt mai rapide și mai sensibile decât aceste metode de hibridizare, tehnici precum RT-PCR sunt adesea preferate, în special pentru măsurarea modificărilor în expresia genelor.

În final, așa cum am indicat în Capitolul 10, hibridizarea fluorescentă *in situ* , FISH este un instrument puternic care se bazează pe hibridizarea directă a unei sonde cu un cromozom sau ARN , fără etapa prealabilă de obținere și separare a fragmentelor *(vezi* Figura 10.9 și figurile 18.8 și 18.9). FISH poate fi efectuată cu cromozomi izolați pe o lamă sau direct *in situ* în secțiuni de țesut sau organisme întregi, în special atunci când embrionii sunt utilizați pentru diverse studii de genetică a dezvoltării (Figura 20.14). De exemplu, în studiile de dezvoltare, este posibil să se identifice ce tipuri de celule dintr -un embrion exprimă gene diferite în timpul diferitelor etape de dezvoltare .

Pentru hibridizarea in situ, o sondă *este marcată pentru o* secvență specifică folosind nucleotide marcate cu un anumit colorant care emite fluorescență sub lumină fluorescentă . De exemplu, atunci când este hibridizată cu un cromozom, sonda poate dezvălui locația specifică a unei gene pe un anumit cromozom . - Variante ale tehnicii FISH sunt, de asemenea, utilizate pentru a obține cariotipuri (uneori numite cariotipuri spectrale), în care cromozomii individuali pot fi detectați folosind sonde marcate cu coloranți care emit fluorescență la diferite lungimi de undă (*vezi* figura de deschidere a capitolului 8 și Figura 19.1) . Cariotipuri

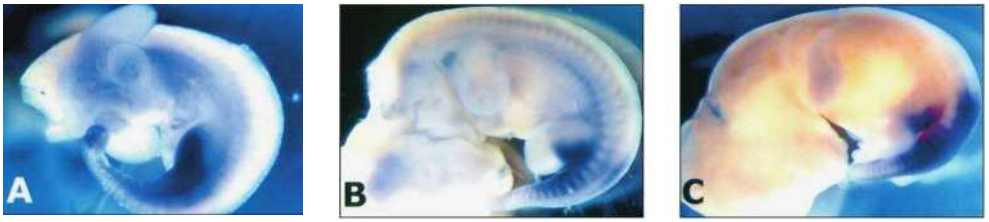


FIGURA 20.14 Hibridizare *in situ* a embrionilor întregi de șoarece, care arată distribuția ARNm-ului *Hoxd1* în timpul dezvoltării. ARN-ul este detectat ca o pată albastru închis în apropierea capătului posterior al embrionului. Capul embrionului este în stânga ; coada în dreapta. La embrionii de șoarece , la 10,5 (A), 11,5 (B) și 12,5 (C) zile de gestație, ARNm-ul Hoxd1 este concentrat în membrele posterioare , vertebre *și* celulele care vor forma ulterior rinichii și organele de reproducere . Aceste date sugerează că produsul *genei* Hoxd1 este implicat în dezvoltarea timpurie a acestor structuri.

Imagistica spectrală s-a dovedit a fi extrem de utilă pentru detectarea delețiilor, translocațiilor, duplicărilor și a altor anomalii ale structurii cromozomiale, cum ar fi rearanjamentele cromozomiale discutate în Capitolul 8, precum și pentru detectarea anomaliilor în celulele canceroase, așa cum este discutat în Capitolul 19.

20,5

Secvențierea ADN-ului este metoda definitivă de a caracteriza structura ADN-ului la nivel molecular

Într-un fel, vom fi caracterizat complet o moleculă de ADN clonată, sau orice ADN, de la o singură genă la un genom întreg, doar atunci când i-am determinat secvența nucleotidică. Capacitatea de a secvenția ADN-ul ne-a extins considerabil înțelegerea organizării genomice, precum și a structurii , funcției și mecanismelor de reglare ale genelor.

Din punct de vedere istoric, cea mai frecvent utilizată metodă de secvențiere a ADN-ului a fost dezvoltată de Fred Sanger și colaboratorii săi și este cunoscută sub numele de secvențiere dideoxinucleotidică sau metoda Sanger. Prin această tehnică, molecula de ADN bicatenară a cărei secvență urmează să fie determinată este convertită în catene simple, care sunt utilizate ca șabloane pentru a sintetiza o serie de catene complementare. ADN-ul care urmează să fie secvențiat este amestecat cu un primer complementar vectorului sau ADN-ului țintă, iar ADN polimeraza și cei patru dezoxiribonucleotide trifosfați (dATP, dCTP, dGTP și dTTP) sunt adăugați în fiecare tub.

Cheia metodei Sanger constă în adăugarea unei cantități mici de dezoxiribonucleotidă modificată (Figura 20.15), numită dideoxinucleotidă (prescurtată ddNTP). Rețineți că dideoxinucleotidele au

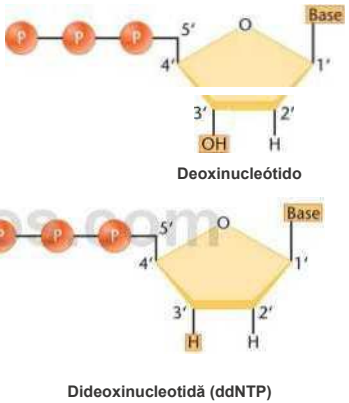


FIGURA 20.15 Deoxinucleotidele (sus) au o grupare OH în poziția 3' a moleculei de dezoxiriboză. Dideoxinucleotidele (jos) nu au o grupare OH și au un singur hidrogen (H) în acea poziție. Dideoxinucleotidele pot fi încorporate într -o catenă de ADN în creștere, dar lipsa grupării OH 3' împiedică formarea unei legături fosfodiesterice cu o altă nucleotidă, oprind astfel alungirea catenei matriță .

un hidrogen 3 ' în loc de o grupare hidroxil 3' . Dideoxinucleotidele sunt numite nucleotide cu terminare de lanț deoarece le lipsește oxigenul 3' necesar pentru a forma o legătură fosfodiesteric cu un alt nucleotid. Prin urmare , atunci când ddNTP-urile sunt incluse într -o reacție în timpul sintezei ADN-ului , polimeraza introduce ocazional o dideoxinucleotidă în loc de o dezoxiribonucleotidă în lanțul de ADN în creștere . Deoarece dideoxinucleotida nu are o grupare OH 3' , nu poate forma o legătură 3' cu un alt nucleotid, iar sinteza ADN-ului

se termină deoarece ADN polimeraza nu poate adăuga nucleotide noi la un ddNTP. Reacția Sanger profită de această modificare fundamentală.

De exemplu, în Figura 20.16, observați că cel mai scurt fragment generat este o secvență în care ddCTP a fost adăugat la capătul 3' al primerului, terminând astfel lanțul. În timp, pe măsură ce reacția progresează, un ddNTP va fi în cele din urmă inserat în fiecare poziție a ADN-ului nou sintetizat, astfel încât fiecare catenă sintetizată va diferi doar cu un nucleotid în lungime și va fi terminată de un ddNTP. Acest lucru permite separarea acestor fragmente de ADN prin

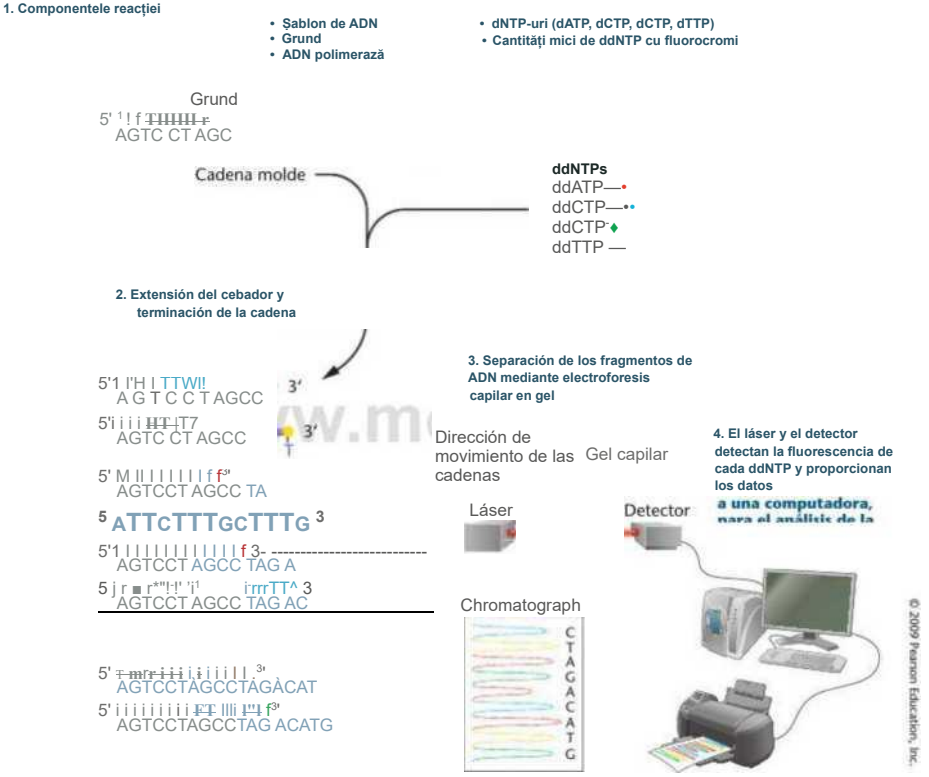

1. Componentele reacției
• Șablon de ADN
• Grund
• ADN polimerază
• dNTP-uri (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
• Cantități mici de ddNTP cu fluorocromi
Grund
AGTC CT AGC
Cadena molde
ddNTPs
ddATP—
ddCTP—
ddGTP
ddTTP —
2. Extensión del cebador y terminación de la cadena
3. Separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis capilar en gel
Dirección de movimiento de las cadenas
Gel capilar
4. El láser y el detector detectan la fluorescencia de cada ddNTP y proporcionan los datos
a una computadora,
Láser
Detector
Chromatograph
C T A G A C A T G
© 2009 Pearson Education, Inc.

FIGURA 20.16 Secvențiere ADN automată pe calculator utilizând metoda Sanger de terminare a lanțului de dideoxinucleotide. (1) Un primer este hibridizat cu o secvență adiacentă ADN-ului care urmează să fie secvențiat (de obicei, în apropierea situsului de clonare multiplu al unui vector de clonare). (2) Un amestec de reacție este adăugat la combinația primer-șablon. Acest amestec de reacție include ADN polimerază, cele patru dNTP-uri și o cantitate molară mică de dideoxinucleotide (ddNTP-uri) marcate cu coloranți fluorescenți. Cele patru ddNTP-uri sunt adăugate în același tub, iar în timpul extensiei primerului , sunt generate toate lungimile posibile ale lanțului . În timpul extensiei primerului, polimeraza introduce ocazional (aleatoriu) un ddNTP în loc de un dNTP, terminând sinteza lanțului deoarece ddNTP-ului îi lipsește gruparea OH necesară pentru a se atașa la următorul nucleotid. În timpul reacției, un ddNTP este inserat la toate situsurile de terminare posibile. Produșii de reacție sunt adăugați pe o singură bandă pe un gel de electroforeză capilară, iar benzile sunt citite folosind un detector și un sistem de imagistică . Acest proces este acum automatizat , iar mașinile robotizate , cum ar fi cele utilizate în Proiectul Genomului Uman , pot secvența câteva sute de mii de nucleotide în 24 de ore , după care datele sunt stocate și analizate automat . Secvența este obținută prin extensia primerului și este citită de pe catena nou sintetizată, nu de pe catena șablon . Prin urmare , secvența rezultată începe cu 5'-CTAGACATG-3'.

electroforează în gel, care poate fi apoi utilizată pentru determinarea secvenței.

Când a fost inventată metoda Sanger, s-au folosit patru tuburi de reacție separate, fiecare conținând un ddNTP diferit (de exemplu, ddATP, ddCTP, ddGTP și ddTTP). Aceste reacții au folosit de obicei un primer marcat radioactiv sau un ddNTP marcat radioactiv pentru analiza secvenței, după electroforeza pe gel de poliacrilamidă și autoradiografie. Această metodă a necesitat utilizarea unor geluri mari de poliacrilamidă, în care fiecare reacție a fost încărcată pe o bandă separată. Modelele de benzi în trepte au fost apoi dezvăluite prin radiografie, citite, iar secvența a fost determinată. Această tehnică originală putea citi de obicei aproximativ 800 de baze din 100 de molecule de ADN simultan. *Lungimea citită,* adică cantitatea de secvență care poate fi generată într-o singură reacție individuală, și lungimea totală a secvenței de ADN generată într-un *proces de secvențiere* , care este egală cu lungimea citită înmulțită cu numărul de reacții pe care un instrument le poate procesa într-o anumită perioadă de timp, au devenit domenii de inovare foarte importante în domeniul tehnologiei de secvențiere.

În ultimii 20 de ani, modificările aduse metodei Sanger au condus la dezvoltarea unor tehnologii care permit acum reacțiilor de secvențiere să aibă loc într-un singur tub, în care fiecare dintre cele patru ddNTP-uri este marcat cu un colorant fluorescent de o culoare diferită (Figura 20.16). Aceste reacții au fost adesea efectuate într-un mod similar cu PCR, folosind cicluri de reacție pentru a obține un randament mai mare și lungimi de citire mai lungi. Produșii de reacție sunt separați folosind un singur gel de poliacrilamidă într-un tub cu diametru ultrafin , o tehnică cunoscută sub numele de electroforeză pe gel capilar . Pe măsură ce fragmentele de ADN se mișcă de-a lungul genei , acestea sunt detectate de un laser. Laserul stimulează coloranții fluorescenți de pe fiecare fragment de ADN , care emit lumină la lungimi de undă diferite pentru fiecare ddNTP. Lumina emisă este captată de un detector care amplifică informațiile și le trimite către un computer, convertind modelele de lumină într - o secvență de ADN care se numește tehnic electroferogramă (Figura 20.17). Datele sunt reprezentate de o serie de vârfuri colorate , fiecare corespunzând unui nucleotid din secvență.

Încă de la începutul anilor 1990 , secvențierea ADN-ului a fost efectuată în principal folosind tehnologia de secvențiere Sanger automată pe calculator , cunoscută sub numele de secvențiere ADN de mare randament automată pe calculator (CTHS) . Aceste sisteme permit generarea unor cantități relativ mari de date despre secvențele de ADN. CTHS poate obține lungimi de citire de aproximativ 1.000 de perechi de baze cu o precizie de aproximativ 99,999%, totul pentru aproximativ 0,50 USD pe kilobyte. Secvențiatoarele automate de ADN conțin adesea mai multe gene asemănătoare firelor de păr (până la 96) lungi de câteva zeci de centimetri și pot procesa câteva mii de perechi de baze de secvențe , multe dintre aceste instrumente făcând posibilă generarea a peste două milioane de perechi de baze de secvențe într -o singură zi. Aceste sisteme s-au dovedit esențiale pentru progresul rapid al Proiectului Genomului Uman .

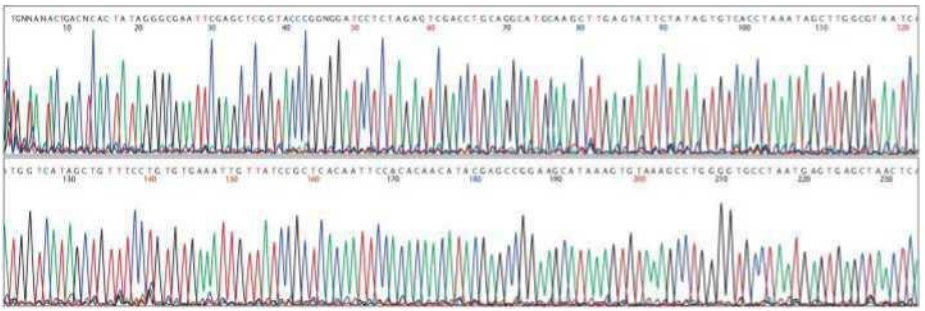


FIGURA 20.17 Un electroferograma, que es la salida generada por un cromatógrafo de secuenciación de ADN automatizado mediante computadora. Cada pico representa el nucleótido correcto de la secuencia. La secuencia, que se extiende desde el cebador (el cual no se muestra aquí), se inicia en la parte superior izquierda del diagrama y se extiende hacia la derecha. I as bases marcadas como N son ambiguas y no pueden identificarse con certeza. Estas lecturas ambiguas de bases son más probables cerca del cebador, porque la calidad de determinación de la secuencia se deteriora cuanto más cerca esté la secuencia del cebador. Las bases separadas se leen por orden a lo largo del eje, de izquierda a derecha. Así, esta secuencia comienza por 5'-TGNNANACTGACNCAC. Los números debajo de las bases indican la longitud de secuencia en pares de bases.

Tehnologiile de secvențiere au progresat rapid

La aproape trei decenii după ce Fred Sanger a primit Premiul Nobel pentru Chimie în 1980 (pe care l-a împărțit cu Walter Gilbert și Paul Berg) pentru tehnologia sa de secvențiere, tehnologiile de secvențiere a ADN-ului au cunoscut o evoluție incredibilă, îmbunătățind considerabil capacitățile de secvențiere . Noi inovații în tehnologiile de secvențiere apar rapid. Tehnicile de secvențiere bazate pe metoda Sanger (în special cele care implică instrumente automatizate de calculator, cum ar fi electroforeza capilară) continuă să joace un rol în aplicațiile de rutină, de zi cu zi, care necesită secvențiere, cum ar fi atunci când trebuie secvențiat un fragment relativ scurt de ADN amplificat prin PCR.

Cu toate acestea, când vine vorba de secvențierea genomurilor întregi, tehnologiile de secvențiere Sanger devin învechite. Costurile secvențierii Sanger sunt relativ mari în comparație cu tehnologiile mai noi, iar rezultatul oferit de metoda Sanger, chiar și cu secvențierea computerizată automată , nu este suficient de rapid pentru a satisface cererea tot mai mare de date genomice. Această cerere este determinată în principal de genomica personalizată *(vezi Capitolul* 21) și de dorința de a descoperi baza genetică a tulburărilor umane, ceea ce va necesita secvențierea a zeci de mii de genomuri individuale. După cum vom vedea în Capitolul 21, cursa pentru dezvoltarea de tehnologii de secvențiere care ne vor permite să secvențiem întregul genom uman al unui individ pentru doar 1.000 de dolari este deja în desfășurare. Se pare că acest obiectiv va fi atins relativ curând, datorită dezvoltării așa -numitelor tehnologii de secvențiere de generație următoare (NGS).

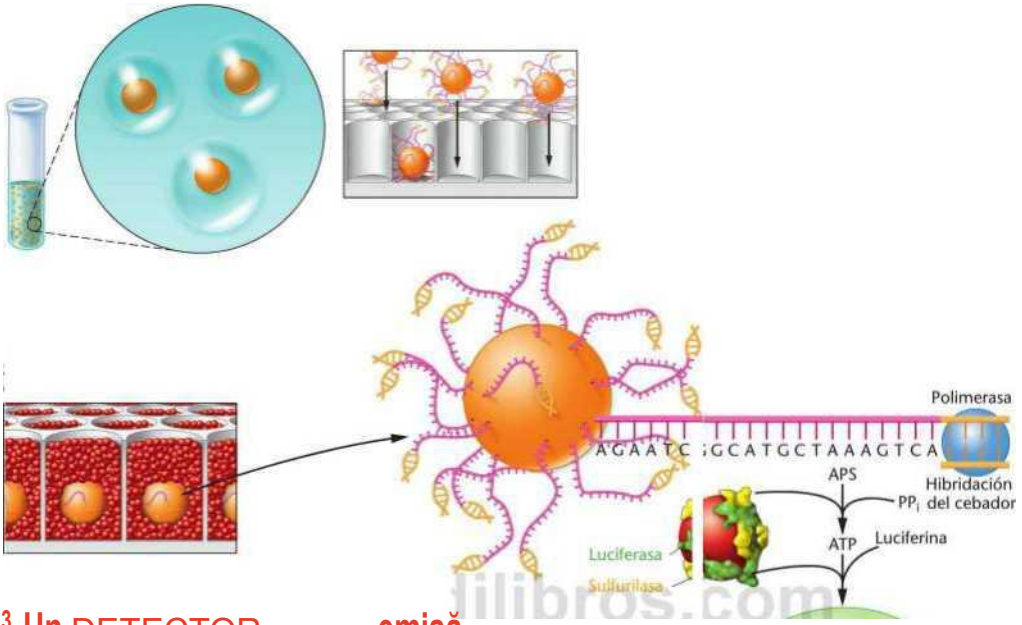
Tehnologii de secvențiere de generație următoare

Dezvoltarea genomicii a impulsionat cererea de secvențiatoare mai rapide, capabile să genereze milioane de baze de secvențe de ADN într-o perioadă scurtă de timp, ceea ce a dus la dezvoltarea tehnicilor de secvențiere de generație următoare (NGS). Aceste tehnologii de secvențiere înlocuiesc metoda Sanger și electroforeza capilară cu tehnici sofisticate de procesare paralelă (formate de reacție simultană) care utilizează tehnici avansate de imagistică cu fluorescență. Tehnologiile NGS oferă o capacitate fără precedent de generare a unor cantități masive de date de secvențe de ADN cu viteză maximă (de până la 200 de ori mai rapid decât tehnologiile Sanger în unele cazuri !) și la un cost mult mai mic per bază.

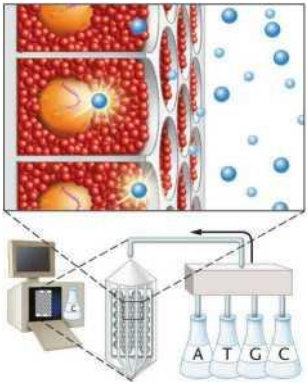
Dorința comunității de cercetare pentru secvențiatoare de ultimă generație, coroborată cu provocări precum secvențierea unui genom pentru doar 1.000 de dolari , a declanșat o cursă acerbă în rândul multor companii dornice să dezvolte metode NGS. Secvențierea de ultimă generație a început în jurul anului 2005. Unele dintre primele instrumente au fost capabile să genereze date echivalente cu 50 de sisteme de electroforeză capilară și sunt de până la 200 de ori mai rapide și mai ieftine decât tehnicile Sanger convenționale. Aceste eforturi sunt conduse de companii importante precum Applied Biosystems (ABI), Roche Life Sciences, Helicos Biosciences (care a dezvoltat o tehnică de secvențiere a unei singure molecule) și Illumina.

În 2005, Roche Life Sciences a fost prima companie care a comercializat o tehnologie de secvențiere de ultimă generație (Figura 20.18). Această tehnică poate fi utilizată pentru secvențierea genomurilor folosind o metodă numită secvențiere în fază solidă , în care o serie de microsfere sunt atașate la ADN genomic fragmentat , care este apoi amplificat prin PCR în picături de apă separate pentru fiecare microsferă și emulsionat în ulei. Microsferele sunt apoi încărcate în plăci cu godeuri multiple și amestecate cu ADN polimerază . Plăcile cu godeuri multiple pot conține mai mult de un milion de godeuri, în fiecare dintre acestea fiind depusă o microsferă , servind drept tub de reacție pentru secvențiere (vezi *Figura* 20.18). O tehnologie de secvențiere numită pirosecvențiere este apoi utilizată pentru secvențierea ADN - ului microsferelor din fiecare godeu . În pirosecvențiere , un singur nucleotid marcat (de exemplu , dATP) este trecut peste godeuri. Fiecare godeu conține o singură microsferă, împreună cu primeri hibridizați cu ADN-ul atașat la microsferă . Când un nucleotid complementar traversează o catenă șablon adiacentă primerului , acesta este adăugat la capătul 3' al primerului de către ADN polimerază . Incorporarea unui nucleotid declanșează eliberarea de pirofosfat, care inițiază o serie de reacții chemiluminiscente (emitente de lumină) care generează în cele din urmă lumină prin acțiunea enzimei luciferază, tipică licuricilor. Lumina emisă de reacție este captată și înregistrată pentru a determina când un nucleotid a fost încorporat într -o catenă. Prin repetarea rapidă a acestei etape de flux de nucleotide cu fiecare dintre cele patru nucleotide posibile pentru a determina următoarea bază din secvență , această tehnică permite generarea de citiri a aproximativ 400 de baze și aproximativ 400 de milioane de baze (Mbp) de date într-un proces de 10 ore . Prin urmare, tehnologiile de secvențiere NGS prezintă provocări semnificative în ceea ce privește gestionarea datelor , deoarece

1. Fragmente de ADN deasupra microsferelor, amplificate prin PCR



3. Un DETECTOR captează lumina **emisă** pentru reacții de siguranță la incendiu



ACGTGGCCCTATAGCTACTCCGACACCTACGCATATCGCCCG
GTATAGCGGGGC
..... Lili

© 2008 Macmillan Publishers Ltd.

FIGURA 20.18 Roche 454: un exemplu de tehnologie de secvențiere de ultimă generație. Tehnologia de secvențiere Roche 454 atașează fragmente de ADN la microsfere. Fragmentele de ADN sunt amplificate prin PCR și apoi adăugate în godeuri (Etapa 1) și supuse pirosecvențierii, așa cum este descris în text. (Etapa 2) În timpul pirosecvențierii, un singur nucleotid fluorescent este trecut peste godeu; în acest caz, este reprezentat de nucleotida G albastră. Dacă ADN polimeraza îl adaugă la un primer, aceasta generează pirofosfat anorganic (PPi), care este convertit în ATP de către sulfurilază (săgeata albastră). Enzima luciferază, tipică licuricilor, folosește ATP pentru a converti luciferina în oxiluciferină, producând lumină. (Etapa 3) Lumina captată de un sistem de detecție este analizată pentru a detecta modelul nucleotidelor adăugate în fiecare godeu. Ciclul de flux este apoi repetat cu fiecare dintre celelalte trei nucleotide. O repetare ciclică continuă a acestui proces generează citiri de secvență de aproximativ 400 de baze.

că este necesară înregistrarea și arhivarea acestor fișiere de date de imagine de mari dimensiuni.

Metodele dezvoltate de Illumina utilizează o tehnică ușor diferită , atașând fragmente de ADN la un suport solid (similar cu microcipurile pe care le vom discuta în Capitolul 21) și apoi utilizând reacții de secvențiere similare reacțiilor de terminare a lanțului de dideoxinucleotide inventate de Sanger. Această tehnică produce lungimi de citire mai scurte (lungime totală de -100 perechi de baze), dar numărul de citiri de secvențiere per rulare este mult mai mare - aproximativ 300 de milioane de citiri per flux. În mod similar, Applied Biosystems (ABI) a dezvoltat o tehnică numită SOLiD (ligaturare și detectare a oligonucleotidelor suportate), care poate produce 6 *gigabaze* de date secvențiale per rulare. Metoda SOLiD combină diverse tehnici pentru secvențierea fragmentelor de ADN legate de microsfere amplificate, similar tehnologiei 454. Cu toate acestea, folosește diferite tehnologii de secvențiere care pot furniza o cantitate mai mare de date secvențiale per rulare a instrumentului. Instrumentația necesară pentru utilizarea acestor platforme este foarte scumpă, dar având în vedere cantitatea enormă de date secvențiale pe care o pot genera metodele NGS, costul mediu per bază este mult mai mic decât în secvențierea Sanger. Conform datelor disponibile în 2006, noile tehnologii de secvențiere permiteau reducerea costurilor de secvențiere la jumătate la fiecare doi ani (Figura 20.19).

În prezent, există o activitate intensă în curs de dezvoltare a secvențiatoarelor de a treia generație, iar toate indiciile arată că aceste instrumente vor fi disponibile în jurul anului 2015. De exemplu, o tehnică promițătoare deja la orizont implică utilizarea nanotehnologiei , inserarea de fragmente de ADN monocatenar în nanopori și apoi tăierea bazelor individuale pentru a produce un semnal care poate fi captat. Această metodă nu necesită amplificarea ADN-ului sau markeri fluorescenți , oferind astfel secvențierea directă a ADN-ului conținut într-o singură catenă.

Comunitatea de cercetare în genomică a îmbrățișat cu entuziasm tehnologiile NGS. Încă nu este clar ce tehnici vor deveni în cele din urmă metode de secvențiere preferate în viitorul apropiat, dar ceea ce este evident este că domeniul secvențierii a progresat enorm și că oamenii de știință nu au avut niciodată capacitatea de a genera atât de multe date secvențiale atât de rapid.

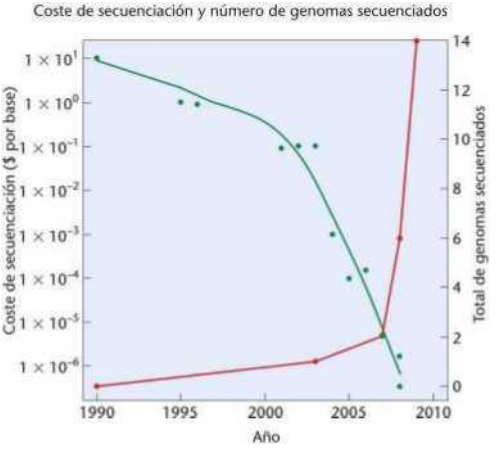


FIGURA 20.19 Progresele rapide în tehnologiile de secvențiere au crescut considerabil productivitatea acestor tehnici *și* au redus semnificativ costurile de secvențiere.

Rețineți provocarea secvențierii unui genom pentru 1.000 de dolari , deoarece totul indică faptul că tehnologia de secvențiere ne va permite să atingem acest obiectiv foarte curând .

Secvențierea ADN-ului și genomică

Încheierea acestui capitol cu o discuție despre secvențierea ADN-ului este o introducere potrivită la Capitolul 21, în care vom discuta în detaliu genomica și subiectele conexe . Tehnicile de bază care alcătuiesc tehnologia ADN-ului recombinant, și în special clonarea ADN-ului , au fost esențiale în a face posibile proiectele de secvențiere a genomului , dar nicio tehnologie nu a avut un impact mai mare asupra capacității noastre de a studia genomurile decât secvențierea ADN-ului . Progresele rapide în tehnologia de secvențiere , care au îmbunătățit considerabil capacitățile metodelor de secvențiere automatizate de computer , au fost determinate de cerințele oamenilor de știință specializați în genom (în special ai celor care lucrau la Proiectul Genomului Uman) care doreau să genereze rapid cantități mai mari de date secvențiale, cu o precizie mai mare și la un cost mai mic .

EXPLORARE
DE GENOMICĂ

Manipularea ADN-ului recombinant: Cartografierea Restricție și design de primeri PCR

zonei de studiu.

Genomică Explorare

C. După cum am văzut în acest capitol, enzimele de restricție sunt un fel de „foarfece" sofisticate pe care biologii moleculari le folosesc pentru a tăia ADN-ul, iar aceste enzime sunt utilizate în mod curent în laboratoarele de genetică și biologie moleculară pentru experimente cu ADN recombinant . Un alt beneficiu al revoluției genomice a fost dezvoltarea unei game largi de instrumente online pentru a ajuta oamenii de știință care lucrează cu enzime de restricție și manipulează ADN-ul recombinant pentru diferite aplicații , cum ar fi cartografierea restricției și proiectarea primerilor pentru experimentele PCR . În - această secțiune , vom explora Webcutter și Primer3, două site-uri care facilitează foarte mult efectuarea experimentelor cu ADN recombinant.

■ Exercițiul I. Crearea unei hărți de constrângeri în Webcutter

Să presupunem că am clonat și secvențiat o genă și dorim să proiectăm o sondă cu aproximativ 600 de perechi de baze lungime pentru a analiza expresia acestei gene în diferite țesuturi umane utilizând hibridizarea Northern blot. Nu cu mult timp în urmă, existau două modalități principale de a realiza această sarcină. ADN- ul clonat putea fi digerat cu orice enzime de restricție aveai la îndemână și apoi utiliza geluri de agaroză pentru a dezvolta hărți de restricție , în speranța de a identifica situsurile de clivaj care ți-ar oferi dimensiunea dorită a fragmentului. Alternativ, ai putea examina vizual secvența , căutând situsurile de restricție de interes - o sarcină foarte plictisitoare și obositoare . Site-uri web precum Webcutter elimină această - incertitudine la dezvoltarea hărților de restricție și facilitează relativ proiectarea experimentelor pentru manipularea ADN-ului recombinant. În acest exercițiu, vom folosi Webcutter pentru a crea o hartă de restricție a ADN-ului uman cu enzimele EcoRI , SarnHI și PstI.

1. Accesați Webcutter la http://ma.lundberg.gu.se/cutter2 . Copiați secvența de ADN uman clonată prezentată mai jos și lipiți-o în caseta de text Webcutter . *(Indiciu:* (Accesați această secvență prin intermediul site-ului web însoțitor pentru a o copia și lipi în Webcutter.)

Secvența ADN-ului uman

CCCCAGGAGACCTGGTTGTG
GAATTCTGTGTGTGAGTGAGTGGTT GAC
CTTC CTC C ATC CC CTGG
TCCTTCCCTTCCCTTCCCGAGGCA
CAGAGAGACAGGGCAGGATCCACG
TGCCATTTGTGGAGGCAGAGA
AAAGAGAAAGTGTTATTATATACGG
TACTTATTAATTATTA III ATATATAGAI CAG
TATTCTTG GTTA ATATTTA ATTTC A
ACTATTTATGAGATGTATCTTTT
GCTCTCTCTTTGCTCTCTTTTGTAC CGG
TTTTTG T ATATA AA ATTC ATG
TTCAATTCCTGACTGACTGACTGACTGACTG
ACTGACTGACTGACTGA CAG AT ATTT A
ATTTTG CT AACACCT T CAGCTCTCTGCCCT
GGCTCCCCAGCACACATTCCTTTGA A ATA
AG GTTTC A ATATAC ATCTAC A TA C TAT
ATAT AT ATTTG GCAACTT
GTATTTGTGTGTATATATATATATTATTAGTT
TGACTTAGTTGATTGATT II I I I
IATATGTAAAAACAAAACAA
GAAAAAATAGAGAATTTCACATAC
TAAATCTCTCTCC III III AATTTTA
ATATTTGTTATCATTTTATT
GGTGCTACTGTTTATCCGTA

ATTGTGGGG AAAAGATATTA
ACATCACGTCTTTGTCTCTAGTG
CAGTTTTTCGAGATATTCCGTAG TA C AT
ATTT ATTTTT A AACAACGA
CAAAGAAATACAGATATATCTTA AAAAAA AA
AAAG CATTTTG
TATTAAAGAATTTAATTCTGATCT
GCAGCTCAAAAAAA AAAAAA

2. Derulați în jos până când vedeți solicitarea „Vă rugăm *să indicați ce enzime să* includeți în analiză". Faceți clic pe butonul care spune „ *Utilizați doar* următoarele enzime". Selectați enzimele de restricție EcoRI , BomHI *și Psti* din lista furnizată , apoi faceți clic pe „ *Analizează secvența".* (Analizați secvența). *Notă:* Folosiți tasta Command, Control sau Shift pentru a selecta mai multe enzime de restricție.
3. După examinarea rezultatelor furnizate de Webcutter, creați un tabel care să arate numărul de situsuri de clivaj pentru fiecare enzimă și dimensiunile fragmentelor care ar fi generate prin digestie cu fiecare enzimă. Desenați o hartă de restricție care să indice situsurile de clivaj pentru fiecare enzimă, exprimând distanțele dintre fiecare situs și dimensiunea totală a acestui fragment de ADN uman .

■ Exercițiul II. Proiectarea unui experiment cu ADN recombinant

Acum, că am creat o hartă de restricție a fragmentului nostru de ADN uman, trebuie să ligăm ADN-ul la un vector ADN plasmidic pentru a putea fabrica sonda noastră (biologii moleculari numesc adesea acest proces subclonare). Pentru a face acest lucru, va trebui să determinăm ce enzime de restricție ar fi cele mai potrivite pentru a tăia atât plasmida, cât și ADN-ul uman.

1. **Secvența de ADN a unei plasmide este prezentată mai jos . Copiați această secvență în caseta de text Web Cutter și identificați locurile de tăiere pentru aceleași enzime pe care le-am folosit în Exercițiul I. Apoi răspundeți la următoarele întrebări:**

   a) Care este dimensiunea totală a ADN-ului plasmidei analizate în Webcutter?

   b) Ce dimensiune va avea molecula de ADN recombinant creată prin unirea acestor fragmente?

   c) Desenați o diagramă simplă care să prezinte ADN-ul clonat inserat în plasmidă și indicați locul sau locurile de clivaj ale enzimelor de restricție utilizate pentru a crea această plasmidă recombinantă.

Secvența de ADN plasmidic

TATAAATATAGAATAATGAAT
CATATAAAACATATCATTATT C ATTT ATTT A C
ATTT A AA ATT ATT
GTTTCAGTATCTTAATTTATTAT
GTATATATAAAATAACTTACA ATTTT ATT A AT
AAACA ATAT ATG
TTTATTAATTCATGTTTTGTAATTTAT
GGGATAGCGATTTTTTTTTTATTAT
GGGATAGCGATTTTTTTTTTATT II II IATT ATT
G TTC IIII I ATAGTATTATTTTAAAA
CAAAATGTATTTTCTAAGAACTTA
TAATAATAATAAATATAAATTTTA
ATAAAATTATATTTATCTTTTTA CAATATG A
AC ATA AAGTAC A
ACATTAATATATAGCTTTTA
ATATTTTTATTCCTAATCATGTA AATCTTAAAI
H I ATTACATATA ITGAAA I ATTACATATA C
ATATTTATT A A ATCTA
GAATTCTATAGTGAGTCGTATTACA
ATTCACTGGCGTTCGTTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAAACCCTGGGCG
TTACCCAACTTAATCGCCTTGCAG
CACATCCCCTTTCGCCAGCTGGCG
TAATAGCGAAGGAGGCCCGCACC
GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG
CAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCT
GATGCGGTATTTTCTCCTTACG
CATCTGTGCGGTTATTCACACCGCA
TATGGTGCACTCTTCAGTACAATCT
GCTCTGATGCCGCATTAGTTAAGC
CAGCCCGACACCCGCCAACACC
CGCTGACGCGCTGACGGGCTT
GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACACA

GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCAC
CGTCATCACCGAAACGCGCGAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCC TAI II I
IATAGGTTAATGTCATGATA
ATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCCCTT
ACTTCATCATGATACCATTGCATGATCCATAT
GATA GCTTCAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
GTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGG
CATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCT
CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAGATGAGTCGATTGAGTTGGTT
GCACGAGTGGGTTACATCGAACTG
GATCTCAATTAGATCGCC
GATCTCAATTAGATCGCC
TTTTCCAATGAGCACTTTTA
AAGTTCTGCTATGGGGCGCGG
TATTATCCCGTATTGACGCCGG
CAAGAGCAACTCGGTCGCCATA
CACTATTCTCTCACTGGATT
GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAG
CATCTTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA
ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCA
ACTTACTTCTGACAACGATCGGAG
GACCGAAGGAGCTAACCGC crin
GCACAACATGGGGGATCATGTA
ACTGATCGGTTGTT
CGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGTAGCAATGCCAACACGTT
GCGCAAACTATTAACTGGCGAAC
TACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
CAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAAGTTGCAGGACCACTTCT
GCGCTCGGCCGCTGTCGCT
GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC
CGGTGAGCGTGGTCTCGGGGTCTCGGGTTA
CATTGCAGCACTGGGGCCAGAT
GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGG
CAACTATGGATGAACGAAATAGA
CAGATCGCTGAGATAGGTAGCTCACTGGTT
CATTAACTGACTTA
TACTTTAGATTGATTTAAAACTT
CATTTTTAATTTAAAAGGATCTA
GGTGAAGATCCTTTTTGAGATAATCT
CATTAGCTGAGTACCATAC
GACCCCGTAGAAAAGATCAAAG G
ATCTTCTTG AG ATC CI IIIIII CT
GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACA
AAAAAACCGCTACCAGCGGTGG
TTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTAC

2. **În timp ce ne pregăteam să realizăm acest experiment de sub-donare , am descoperit că datele de expirare ale majorității enzimelor noastre de restricție trecuseră de mult. În loc să efectuăm un experiment cu enzime vechi, am decis să cumpărăm altele noi. Din fericire, există un site web care ne poate ajuta: REBASE®: Baza de date a enzimelor de restricție. Există peste 300 de enzime de restricție disponibile comercial la un preț relativ scăzut, dar oamenii de știință încearcă întotdeauna să profite la maximum de bugetele lor de cercetare . REBASE este excelent pentru localizarea furnizorilor de enzime și a datelor specifice despre aceștia, în special atunci când trebuie să lucrăm cu o enzimă cu care nu suntem familiarizați. Vizitați REBASE® la http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html pentru a identifica companiile care vând enzima (enzimele) de restricție de care avem nevoie pentru acest experiment.**

■ **Exercițiul III. Proiectarea primerilor PCR**

Când ne-am oprit să ne gândim la acest - experiment, am decis să încercăm mai întâi PCR cu transcriptază inversă (RT-PCR) în loc de Northern blot, deoarece RT-PCR este o modalitate mai rapidă și mai sensibilă de a detecta expresia genelor. Alegerea primerilor potriviți pentru un experiment PCR nu este un proces banal. Trebuie să ne asigurăm că primerii pot amplifica gena de interes și, de asemenea, trebuie să evităm autohibridizarea primerilor - adică legarea primerilor între ei - printre multe alte considerații. Din fericire, proiectarea primerilor este o altă sarcină pe care internetul o face considerabil mai ușoară. În acest exercițiu, vom folosi Primer3, un site web de proiectare a primerilor PCR creat de *Institutul Whitehead pentru Cercetări Biomedicale.*

1. Accesați Primer3 prin intermediul adresei http://frodo.wi.mit.edu/primer3 . Copiați secvența de ADN uman din Exercițiul I în caseta de text *și* apoi faceți clic pe *Alegeți - primeri* .
2. Pe pagina următoare, secvențele corespunzătoare primerilor recomandați vor apărea în partea de sus a ecranului. Răspundeți la următoarele întrebări:

a) Care este lungimea , în perechi de baze , a primerilor stângi (direct) și drept (direct)? Unde se leagă fiecare dintre acești primeri în secvența genică ?

b) Temperatura de hibridizare pentru o reacție PCR este de obicei stabilită la aproximativ 5 grade sub temperatura de topire , sau *T_m* (vezi Capitolul 10 pentru explicații despre temperatura de topire). Având în vedere temperatura *T_m* a acestor primeri, care ar putea fi temperatura optimă de hibridizare pentru acest experiment?

c) Care credeți că ar fi dimensiunea produsului PCR generat de acești primeri, dacă ADN-ul amplificat prin această reacție PCR ar fi procesat pe un gel de agaroză ?

STUDIU DE CAZ | Ar trebui să ne preocupe tehnologia ADN-ului recombinant?

LA La începutul anilor 1970 , când au fost dezvoltate pentru prima dată tehnicile de cercetare a ADN-ului recombinant, oamenii de știință și-au dat seama că acestea implicau multe pericole potențiale. După un moratoriu autoimpus asupra tuturor acestor cercetări, au dezvoltat și implementat un set detaliat de protocoale de siguranță pentru construirea , depozitarea și utilizarea organismelor modificate genetic. Aceste linii directoare au format ulterior baza reglementărilor adoptate de guvernul federal al SUA. De-a lungul timpului, au fost dezvoltate metode mai sigure, iar aceste linii directoare stricte au fost treptat relaxate sau, în multe cazuri, eliminate complet. Acum, însă, spectrul bioterorismului a adus o atenție reînnoită asupra utilizărilor potențial periculoase ale tehnologiei ADN-ului recombinant . De exemplu, anumite persoane sau grupuri mici ar putea utiliza informații din bazele de date genomice , împreună cu tehnologia ADN-ului recombinant, pentru a construi sau reconstrui agenți patogeni, cum ar fi virusul variolei sau virusul gripal mortal din 1918 .

1. Credeți că ar trebui revizuită problema reglementării cercetării ADN-ului recombinant de către universități și companii pentru a ține cont de posibilele activități de bioterorism ?
2. accesul public și liber la bazele de date genetice, inclusiv genomuri complete și secvențe de gene sau proteine , sau accesul ar trebui limitat, acordându-se doar persoanelor care au fost verificate și aprobate în mod corespunzător?
3. La patruzeci de ani de la dezvoltarea sa , utilizarea tehnologiei ADN-ului recombinant este larg răspândită și poate fi găsită chiar și în multe cursuri universitare de biologie . Există aspecte ale splicingului genelor care ar putea fi periculoase în mâinile unui amator ?

resumen

1. Tehnologia ADN-ului recombinant a fost posibilă prin descoperirea unor proteine specifice numite enzime de restricție, care taie ADN-ul la secvențe de recunoaștere specifice, producând fragmente ce se pot uni cu alte fragmente de ADN pentru a forma molecule de ADN recombinant.
2. Moleculele de ADN recombinant pot fi transferate către diverse tipuri de celule gazdă, în care copii clonate ale ADN-ului sunt produse în timpul replicării celulei gazdă. Multe tipuri de celule gazdă pot fi utilizate pentru replicare, inclusiv bacterii, drojdii și celule de mamifere .
3. Reacția în lanț a polimerazei (PCR) permite amplificarea ADN-ului fără utilizarea celulelor gazdă și este o metodă rapidă și sensibilă, cu o gamă largă de aplicații .
4. Din punct de vedere istoric, bibliotecile de ADN au fost importante în producerea de colecții de gene clonate, pentru identificarea genelor și regiunilor de reglare a genelor de interes.
5. Odată clonate, secvențele de ADN sunt analizate folosind diverse tehnici moleculare care permit oamenilor de știință să studieze expresia, funcția și structura genelor .
6. unui segment de ADN, secvențierea ADN-ului este modalitatea definitivă de a caracteriza ADN-ul la nivel molecular.
7. Progresele rapide în tehnologiile de secvențiere de generație următoare au dus la o creștere semnificativă a capacității de secvențiere și la o reducere a costurilor în comparație cu metodele de secvențiere utilizate în mod tradițional . Acest lucru a oferit oamenilor de știință acces fără precedent la datele secvențiale .

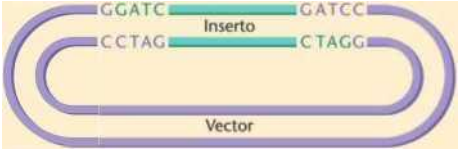
Pentru a vizualiza activități, animații și întrebări de recapitulare, consultați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Secvența de recunoaștere a enzimei de restricție SauJAI este GATC *(vezi* Figura 20.1); în secvența de recunoaștere a enzimei BamHI — GGATCC— , cele patru baze interne sunt identice cu secvența &uBAI. Capetele monocatenare produse de cele două enzime sunt identice. Să presupunem că aveți un vector de clonare care conține o secvență de recunoaștere BamHI și ADN străin pe care l-ați tăiat cu Suu3AI.

   (a) a) Poate fi acest ADN ligaturat în situsul BamHI al vectorului și, dacă da, de ce? (b) Poate fi segmentul de ADN clonat la această secvență tăiat din vector folosind Sau3AI? Și cu BamHI? Ce probleme potențiale ar putea apărea cu utilizarea BamHI ?

   Soluție, (a) ADN-ul tăiat cu Suu3AI poate fi ligat la situsul de tăiere BamHI al vectorului deoarece capetele monocatenare generate de cele două enzime sunt identice. (b) ADN-ul poate fi tăiat din vector cu Sau3AI deoarece secvența de recunoaștere pentru această enzimă (GATC) este menținută pe ambele părți ale insertului . Recuperarea insertului clonat cu BamHI este mai problematică. În vectorul ligat, secvențele conservate sunt GGATC (stânga) și *GATCC* (dreapta). Baza corectă pentru recunoașterea de către BamHI urmează *doar* la secvența conservată (pentru a produce GGATCC în stânga) aproximativ 25% din cazuri, în timp ce baza corectă va *preceda* doar la secvența cu prezervat (și va produce GGATCC în dreapta) tot în aproximativ 25 % din cazuri . Astfel, BamHI va putea tăia inserția vectorială (0,25 x 0,25 - 0,0625), adică doar în 6 % din cazuri .



Probleme și întrebări pentru discuții (MGJ) *Pentru a vedea memoriile și tonalitățile atribuite de profesor , consultați www.masteringgenetics.com*

DE CUM ȘTIM?

de ADN pot fi copiate , identificate, caracterizate și secvențiate . Pe parcursul procesului , am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să obținem o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?

(a) Într -un experiment de clonare a ADN-ului recombinant , cum putem determina dacă fragmentele de ADN de interes au fost încorporate în plasmide și, odată ce celulele gazdă sunt

(c) Ce etape fac din PCR o reacție în lanț, capabilă să producă milioane transformadas, qué células contienen el ADN recombinante?

(b) Cuando se emplean genotecas de ADN para donar genes, ¿que combinación de técnicas se utiliza para identificar un gen concreto de interés?

de copii ale unei anumite molecule de ADN în câteva ore , fără a fi nevoie să se utilizeze celule gazdă?

(d) Cum a evoluat tehnologia de secvențiere a ADN-ului ca răspuns la nevoile emergente ale oamenilor de știință care studiază genomul ?

2. Ce roluri joacă enzimele de restricție, vectorii și celulele gazdă în studiile ADN-ului recombinant?
3. Gena insulinei umane conține mai multe secvențe care sunt șterse în timpul procesării transcrierilor ARNm . În ciuda faptului că celulele bacteriene nu pot șterge aceste secvențe din transcrierile ARNm , explicați cum poate fi clonată o astfel de genă într-o celulă bacteriană pentru a produce insulină.
4. Ce rol joacă ADN ligaza într -un experiment de clonare a ADN-ului ? Cum diferă acțiunea ADN ligazei de funcția enzimelor de restricție?
5. Deși multe aplicații de clonare implică introducerea ADN-ului recombinant în celulele gazdă bacteriene, multe alte tipuri de celule sunt, de asemenea, utilizate ca gazde pentru ADN-ul recombinant . De ce?
6. Când ADN -ul unui segment de ADN clonat este secvențiat , se recuperează secvența de nucleotide prezentată mai jos . Conține acest segment un situs de recunoaștere palindrom pentru o enzimă de restricție? Dacă da , care este secvența ?
7. Situsurile de restricție sunt palindromice; adică, se citesc la fel pe ambele catene de ADN în direcția 5' spre 3'. Care este avantajul de a avea situsuri de restricție organizate în acest fel?
8. Enumerați avantajele și dezavantajele utilizării plasmidelor ca vectori de clonare . Ce avantaje au cromozomii BAC și YAC ca vectori de clonare în comparație cu plasmidele?

de doble cadena de este palíndromo y qué enzima cortaría por este sitio? (Consulte la lista de sitios de restricción de la Figura 20.1.)

CAGTATCCTAGGCAT

9. Care sunt avantajele utilizării unei enzime de restricție al cărei situs de recunoaștere este relativ rar? Când ați utiliza astfel de enzime?
10. Introducerea genelor în plante este o practică obișnuită care nu numai că a dus la crearea unei game largi de alimente modificate genetic, dar a stârnit și controverse considerabile la nivel mondial. Interesant este că o plasmidă care induce tumori este adesea utilizată pentru a produce - plante modificate genetic. Credeți că originea acestei controverse constă în utilizarea unei plasmide care induce tumori?

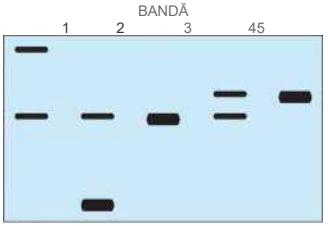
11. În contextul tehnologiei ADN-ului recombinant , ce aplicații are o sondă?
Dacă efectuăm un experiment PCR pornind de la o singură copie de ADN
12. bicatenar, aproximativ câte molecule de ADN vor fi prezente în tubul de reacție
după 15 cicluri de amplificare ?
Într-un experiment de control, o plasmidă care conține o secvență de recunoaștere HindII în cadrul unei gene de rezistență la kanamicină este
13. scindată cu *HindII,* religatată *și* utilizată pentru a transforma celule E. *coli* . K12. Coloniile rezistente la kanamicină sunt selectate , iar ADN-ul lor plasmidic este supus electroforezei . Majoritatea coloniilor conțin plasmide care produc o singură bandă care migrează cu aceeași viteză ca plasmida intactă originală . Câteva colonii, însă , produc două benzi: una de dimensiunea originală și alta care migrează mult mai rapid pe gel. Desenați o diagramă a originii acestei benzi mai lente, un produs al ligării.
Imaginați-vă că tocmai am generat prima bibliotecă genomică din lume pentru okapi african, o rudă a girafei. Nicio genă din acest genom nu a fost descrisă sau izolată anterior. Dorim să izolăm din biblioteca de okapi gena care codifică proteina transportoare de oxigen β-globină . Această genă a fost deja izolată
14. la om, iar secvențele sale de nucleotide și aminoacizi sunt disponibile în baze de date . Folosind informațiile disponibile despre gena β-globinei umane , care sunt cele două strategii care pot fi utilizate pentru a izola această genă din biblioteca de okapi?
oferă bibliotecile de ADNc în comparație cu bibliotecile de ADN genomic ? Descrieți câteva aplicații de clonare în care este necesară o bibliotecă genomică pentru a furniza informații pe care o bibliotecă de ADNc nu le poate furniza .
Un coleg ne -a furnizat o bibliotecă de ADNc cu gene umane clonate în vectori
15. plasmidici bacterieni . Având gena de drojdie donată care codifică EF-la, o proteină extrem de conservată printre eucariote, folosim gena de drojdie ca sondă pentru a izola o clonă de ADNc care conține gena EF-la umană. Secvențiem gena umană și constatăm că are 1.384 de perechi de baze . -
Folosind această clonă de ADNc ca sondă, izolăm ADN-ul care codifică EF -
16. la dintr -o bibliotecă de genom uman . Secvențiem clona genomului și constatăm că are 5.282 de nucleotide . Ce explică diferența de lungime observată între clona de ADNc și clona genomului ? Imaginați-vă că am recuperat un segment de ADN clonat dintr -un vector și am determinat că insertul are 1.300 de perechi de baze . Pentru a caracteriza acest segment clonat , am izolat insertul și am decis să construim o hartă de restricție . Folosind enzimele I și II și după electroforeza pe gel, am determinat numărul și dimensiunea fragmentelor produse de enzimele I și II singure și în combinație, așa cum se arată în tabelul următor. Construiți o hartă de restricție din aceste date, indicând pozițiile relative ale situsurilor de scindare ale enzimelor de restricție și distanțele dintre ele în perechi de baze .

17.

Enzime	Dimensiunea fragmentelor de constrângere (pb)
	350, 950
II.	200, 1.100
lyII	150, 200, 950

22

Pentru a crea o bibliotecă de ADNc, ADNc poate fi inserat în vectori și clonat. În analiza clonelor de ADNc , este adesea dificil să se găsească clone de lungime completă; adică , multe clone sunt mai scurte decât moleculele de ARNm mature din care au fost derivate . De ce se întâmplă acest lucru ?
Deși capturarea și comerțul cu maimuțe mari au fost interzise în 112 țări din 1973 , se estimează că aproximativ 1.000 de cimpanzei sunt luați anual din Africa și introduși ilegal în Europa, Statele Unite și Japonia. Acest trafic ilegal este adesea deghizat prin simularea nașterilor în captivitate. Până de curând , testele de identitate genetică nu au fost utilizate pentru a detecta aceste activități ilegale din cauza lipsei de markeri extrem de polimorfici (markeri care variază de la individ la individ) și a dificultății de a obține probe de sânge de cimpanzei. A fost raportat un studiu în care probele de ADN au fost extrase din rădăcinile firelor de păr de cimpanzeu proaspăt smulse și utilizate ca șabloane pentru PCR . Primerii utilizați în aceste studii flanchează situsuri extrem de polimorfice în ADN-ul uman, care rezultă dintr -un număr variabil de repetiții nucleotidice în tandem . Mai mulți pui suspectați de cimpanzeu și presupușii
20.
21.
lor părinți au fost analizați pentru a determina dacă puii erau „legitimi" sau produsul traficului ilegal . Datele de hibridizare Southern sunt prezentate mai
19. jos . Examinați cu atenție aceste date și alegeți cea mai bună concluzie:
(a) Niciunul dintre urmași nu este legitim.
(b) Descendenții B și C nu sunt descendenți ai acestor părinți și probabil au fost achiziționați de pe piața neagră . Datele sunt în concordanță cu ideea că descendentul A este legitim.
(c) Descendenții A și B provin din părinții arătați, dar C nu și probabil a fost cumpărat de pe piața neagră.
(d) există date suficiente pentru a trage concluzii. Ar trebui analizate și alte situri polimorfice .
(e) se pot trage concluzii, deoarece s-au folosit agenți de amorsare „umani" .



Banda 1: tată cimpanzeu
Banda 2: Mamă cimpanzeu
Liniile 3-5: descendenții putativi A, B și C

Enumerați pașii implicați în procesul de trasare a unei biblioteci genomice. Ce ar trebui să știm înainte de a începe această procedură? Care sunt potențialele probleme ale acestei proceduri și cum pot fi rezolvate sau minimizate? Pentru a estima numărul de situsuri de tăiere într- un fragment specific de ADN de dimensiune cunoscută, putem aplica formula N/4, unde *N* este numărul de perechi de baze ale ADN-ului țintă , iar *n* este numărul de baze din secvența de recunoaștere a enzimei de restricție . Dacă secvența de recunoaștere pentru *Bam-* mHI este GGATCC și ADN-ul fagic conține aproximativ 48.500 de perechi de baze, câte situsuri de clivaj ar fi de așteptat?
Într-o reacție PCR tipică , descrieți ce se întâmplă în etapele care au loc în intervalele de temperatură (a) 90-95 °C, (b) 50-70 °C și (c) 70-75 °C.
De obicei, credem că enzimele sunt cele mai active în jurul valorii de 37°C, însă în PCR, ADN polimeraza este supusă unor expuneri multiple la temperaturi relativ ridicate și pare să funcționeze corect la 70-75 °C. Ce este atât de

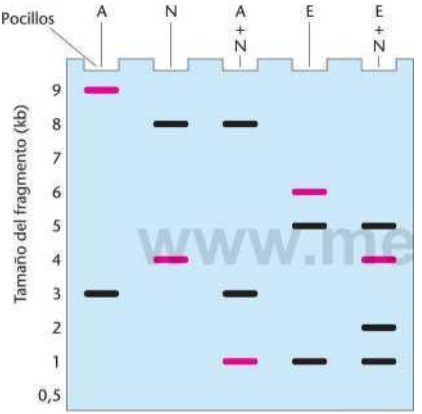
special la enzimele de polimerizare a ADN utilizate în mod normal în PCR?

24. Ce diferență structurală au dideoxinucleotidele (ddN-TP) față de deoxinucleotidele (dNTP) și de ce această diferență structurală face ca ddNTP-urile să fie utile în metodele de secvențiere a ADN-ului bazate pe terminarea lanțului de dideoxinucleotide ?
25. Să presupunem că am efectuat o reacție de secvențiere a ADN-ului folosind metoda de terminare a lanțului de dideoxinucleotide (metoda Sanger). Am efectuat corect toți pașii și am supus corect și fragmentele de ADN rezultate electroforezei, dar la examinarea gelului de secvențiere, observăm că multe dintre benzi sunt duplicate (în ceea ce privește lungimea) pe alte benzi. Ce s-ar fi putut întâmpla?
26. Cum se utilizează hibridizarea fluorescentă *in situ* pentru a produce un cariotip spectral?

Probleme suplimentare picante

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

27 Gelul prezentat mai jos prezintă modelul de bandare al fragmentelor produse cu diverse enzime de restricție. Enzimele utilizate sunt identificate deasupra și dedesubtul gelului . Sunt prezentate, de asemenea, șase hărți de restricție posibile .



E=fcoRI N=Ñcol A=AodI I

	N		ŞI	LA		ŞI	
0	2	4	6	8	10		12 kb
	O		E.	N		E.	
				1.		1	
0	2	4	6	8	10		12 kb
			E.	PROP		E.	
				RIU		J	
0	2	4	6	8	10		12 kb
	N	O	E.			E.	
	1						
0	2	4	6	8	10		12 kb
	LA	N	ŞI			ŞI	
		-L				J	
0	2	4	6	8	10		12 kb
EA		N	N	A E			
1 1		1					
0	2	4	6	8 kb			

Una dintre cele șase hărți de restricție prezentate este în concordanță cu modelul de benzi prezent în gel.

(a) Pe baza analizei modelului de benzi de gel , selectați harta corectă și explicați raționamentul.

(b) Aplicând metoda de hibridizare Southern acestui gel, benzile evidențiate (roz) hibridizează cu gena *pep.* Unde se află gena *pep* ?*

28. O metodă utilizată pe scară largă pentru calcularea temperaturii de - hibridizare a primerilor utilizați într- o PCR este cu 5 grade sub Tm (° C), care se calculează conform ecuației

81,5 + 0,41 (%GC) - (675/N), unde %GC este procentul de nucleotide GC ale oligonucleotidului și *N* este lungimea aceluiași . Rețineți că în această formulă atât conținutul GC , cât și lungimea oligonucleotidului sunt variabile. Presupunând că aveți oligonucleotida prezentată mai jos ca primer , calculați temperatura de hibridizare pentru PCR. Care este relația dintre T_m (°C) și %GC? *(Notă:* În realitate, acest calcul oferă doar un punct de plecare pentru determinarea empirică mai utilă a temperaturii de hibridizare.

5'-TTGAAAATATTTCCCATTGCC-3'

29. Majoritatea tehnicilor descrise în acest capitol (hibridizare, clonare, PCR etc.) depind de atracțiile intermoleculare (hibridizare) dintre diferite populații de acizi nucleici . Lungimea lanțului , temperatura și procentul de nucleotide GC au o influență considerabilă asupra asocierilor intermoleculare. Alte două componente utilizate în mod obișnuit în protocoalele de hibridizare sunt ionii monovalenți și formamida. O formulă care ia în considerare concentrațiile ionului monovalent (Na^+) și formamidei pentru a calcula o T _m (temperatura de topire) este următoarea :

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log M(Na^+)) + 0,41\%GC - 0,72(\%formamidă)$$

(a) Pentru următoarele concentrații de Na^+ și formamidă, calculați T_m. Presupuneți un conținut de GC de 45%.

N / A*	% Formamidă
0,825	20
0,825	40
0,165	20
0,165	40

(b) Având în vedere că formamida concurează pentru pozițiile de legături de hidrogen ale bazelor acidului nucleic și că cationii *monovalenți* sunt atrași de sarcinile negative ale acizilor nucleici, explicați de ce Tm variază așa cum este descris în partea (a).

30. Departamentul de Justiție al SUA a creat o bază de date care cataloghează produsele de amplificare PCR ale cromozomului Y cu repetiții scurte în tandem (Y -STR) la oameni. Baza de date conține polimorfisme de la cinci grupuri etnice din Statele Unite (afro-americani, americani europeni, hispanici, nativi americani și americani de origine asiatică) , precum și din populația globală .
(a) Având în vedere că STR-urile sunt repetiții de lungime variabilă, de exemplu (TCTG), $_{17}$ sau (TAT) $_{6}$, explicați cum ar putea PCR să dezvăluie diferențe (polimorfisme) între indivizi . Cum ar putea Departamentul de Justiție să utilizeze astfel de diferențe?
(b) Genele Y-STR ale regiunii nerecombinante a cromozomului Y (NRY) sunt deosebit de relevante pentru aplicațiile criminalistice. De ce?
(c) Care ar fi utilitatea cunoașterii diferențelor dintre diferite populații etnice în ceea ce privește polimorfismele Y - STR ?
(d) În aplicațiile criminalistice , probabilitatea unei „ potriviri ” între o probă de ADN de la locul crimei și ADN-ul unui suspect determină adesea un verdict de vinovăție sau nevinovăție . Cum se determină o „potrivire” și care sunt utilizările și limitele unor astfel de probabilități ?

31. Există mai multe circumstanțe în care obținerea unor rezultate rapide utilizând markeri în amplificările PCR este extrem de dezirabilă , cum ar fi în aplicațiile criminalistice, analiza agenților patogeni sau detectarea organismelor modificate genetic . În PCR multiplex , se utilizează mai multe seturi de primeri, cu mai puțin succes decât atunci când sunt aplicate PCR ca un singur set. Numeroase studii au fost efectuate pentru a optimiza procedurile, dar toate concluzionează că procesul este plictisitor și adesea eșuează. Având în vedere informațiile furnizate în Problema 29 , de ce ar putea diferi PCR multiplex de PCR cu un singur primer în ceea ce privește fiabilitatea și ușurința optimizării ?

Alineamiento en el que se comparan las secuencias de ADN del gen de la leptina en perros (arriba) y seres humanos (abajo). Las líneas verticales y los cuadros sombreados indican identidad de bases. *LEP* codifica una hormona que funciona como supresor del apetito. Este tipo de análisis es una de las aplicaciones comunes de la bioinformàtica y constituye una buena demostración de la genómica comparativa.

AGGCCAACAAGCACAGCCGGGGAACCAAAATGCCTTGTGGACCTCTGTGCCGA I II II III IIIi II II I II IIIII II II III III I I III I II AGGCCCAAGAAGC -CATCCTGGGGAAGGAAAATGCATTGGGGAACCCTGTGCGGA

TGGCTTTGGCCCTATCTGTCCTGTGTTGAAGCTGTGCCAATCCGAAAAGTCCAG I II I IIIII II I II III I I III III I I IIII IIIi II II IIII I TGGCTTTGGCCCTATCTTTTCTATGTCCAAGCTGTGCCCATCCAAAAAGTCCAA

ACCAAAACCCTCATCAAGACGATTGTCGCCAGGATCAATGACATTTCACACACG II IIIII I II I I I III I III I I II IIII IIIIIIII IIIII IIII IIIII ACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACCAGGATCAATGACATTTCACACACG

GTCTCCTCCAAACAGAGGGTCGCTGGTCTGGACTTCATTCCTGGGCTCCCAACCA I II I III I II I II III I III II I I II III II II I II I I I I II II GTCTCCTCCAAACAGAAAGTCACCGGTTTGGACTTCATTCCTGGGCTCACCCC

ACTTTGTCCAGGATGGACCAGACGTTGGCCATCTACCAACAGATCCTCAACAGT I II IIIi I III I I I IIII IIIi IIII III I III II III II IIIi ACCTTATCCAAGATGGACCAGACACTGGCAGTCTACCAACAGATCCTCACCAGT

TCCAGAAATGTGGTCCAAATATCTAATGACCTGGAGAACCTCCGGGACCTTTCTC III I I I I III II I IIIIII II II II I II I IIIII III I IIII I I II TCCAGAAACGTGATCCAAATATCCAACGACCTGGAACCTCCGGATCTTCTT

21

Genomică, bioinformatică și proteomică

CONCEPTE CAPITOL

Genomica aplică ADN - ul recombinant, metodele de secvențiere a ADN-ului și bioinformatica pentru secvențierea, asamblarea și analizarea genomurilor .

►► **Disciplinele genomicii cuprind diverse domenii de studiu, inclusiv genomica structurală și funcțională, genomica comparativă și metagenomica , provocând o adevărată revoluție „omică" în biologia modernă.**

►► **Bioinformatica combină tehnologia informației cu biologia și matematica pentru a stoca, partaja, compara și analiza date despre acizii nucleici și secvențele de proteine.**

►► **Proiectul Genomului Uman a avansat considerabil cunoștințele noastre despre organizarea, dimensiunea și funcția genomului uman.**

►► **La zece ani de la încheierea Proiectului Genomului Uman, o nouă eră a studiilor genomice oferă o mai bună înțelegere a genomului uman.**

►► **Analizele genomice comparative între organismele model procariote și eucariote au relevat asemănări și diferențe în ceea ce privește dimensiunea și organizarea genomului.**

►► **Metagenomica este studiul genomurilor din probe de mediu și este foarte valoroasă pentru identificarea genomurilor microbiene.**

►► **Analiza transcriptomului oferă informații despre modelele de expresie genică și activitatea de reglare a genelor într -un genom.**

Proteomica se concentrează pe conținutul proteic al celulelor și pe structura , funcția și interacțiunile proteinelor .

►► **Tehnicile de biologie a sistemelor urmăresc să descopere interacțiunile complexe dintre gene, proteine și alte componente celulare .**

1. Termenul genom se referă la setul complet de ADN dintr-o SINGURĂ celulă— Termenul „linkage genetic" a fost inventat în 1920, când geneticienii au început să treacă de la studierea genelor individuale la analizarea imaginii de ansamblu. Pentru a începe să utilizeze toate genele din ADN-ul unui organism , geneticienii au urmat de obicei o metodă în doi pași: (1) identificarea mutațiilor spontane sau colectarea mutanților produși de agenți chimici sau fizici și (2) generarea de hărți de linkage folosind tulpini mutante, așa cum am văzut în Capitolul 5 .

Aceste strategii extrem de eficiente, dar consumatoare de timp, au fost utilizate pentru a identifica gene la multe dintre organismele model clasice pe care le-am văzut în carte , cum ar fi *Drosophila,* porumbul, șoarecii și drojdia, precum și la virusuri, cum ar fi bacteriofagii. Aceste metode au format baza tehnică a analizei genetice și sunt încă utilizate astăzi. Cu toate acestea, ele au câteva limitări importante. De exemplu, analiza convențională a mutațiilor și a linkage-ului necesita ca cel puțin o mutație să fie disponibilă pentru fiecare genă înainte ca toate genele dintr -un genom să poată fi identificate . Obținerea de mutanți și efectuarea studiilor de linkage consumă mult timp, iar atunci când mutațiile sunt letale sau nu au un fenotip clar, cartografierea lor poate fi foarte dificilă sau chiar imposibilă. În plus , deși cercetătorii pot genera mutații la modelele animale într-un laborator, același lucru nu se poate face și cu oamenii. Prin urmare, identificarea genelor umane prin analiza mutațională este în mare măsură limitată la cartografierea linkage-ului genelor mutante moștenite sau dobândite spontan cu fenotipuri clare. O altă limitare fundamentală a acestor tehnici este că , deși pot fi utilizate pentru a identifica și caracteriza locusurile genetice , ele nu permit determinarea secvenței ADN-ului. Nici nu sunt deosebit de utile pentru studierea regiunilor necodificatoare ale genomului, cum ar fi secvențele de ADN reglatoare.

În 1977, pe măsură ce tehnicile de ADN recombinant erau dezvoltate, Fred Sanger și colegii săi au fost pionieri în domeniul genomicii (studiul genomurilor) utilizând o metodă de secvențiere ADN recent dezvoltată pentru a secvența genomul virusului OX174 , care constă din 5.400 de nucleotide . Alte genomuri virale au fost secvențiate la scurt timp după aceea, dar chiar și această tehnologie a fost lentă și laborioasă , limitându -i utilizarea la genomuri mici. În anii 1980, geneticienii interesați de cartografierea genelor umane au început să utilizeze tehnologia ADN recombinant pentru a mapa secvențele de ADN la cromozomi specifici. Inițial , majoritatea acestor secvențe nu erau de fapt gene întregi, ci mai degrabă secvențe marker , cum ar fi polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție (RFLP) . Odată mapați la cromozomi, acești markeri au fost utilizați pentru analiza genealogică pentru a stabili o legătură între markeri și fenotipurile corespunzătoare ale bolilor și tulburărilor genetice . Această tehnică, numită clonare poziționlă , a fost utilizată pentru a cartografia, izola, clona și secvența genelor pentru fibroza chistică, neurofibromatoză și zeci de alte afecțiuni. Clonarea poziționlă a permis identificarea unei singure gene pe rând, însă, până la mijlocul anilor 1980 , fusese deja utilizată pentru a cartografia peste 3.500 de gene și markeri pe cromozomii umani.

La acea vreme, se estima că existau aproximativ 100.000 de gene în genomul uman și era clar că cartografierea acestuia folosind metodele existente ar fi o sarcină laborioasă, lungă și practic - imposibilă. După cum vom vedea în curând, această estimare a numărului de gene s-a dovedit a fi destul de inexactă. În următoarele trei decenii, dezvoltarea metodelor de secvențiere a ADN-ului automatizate de computer a făcut posibilă începerea luării în considerare a secvențierii genomurilor mult mai lungi și mai complexe ale organismelor eucariote, inclusiv a celor 3,1 miliarde de nucleotide care alcătuiesc genomul uman . Dezvoltarea tehnologiilor ADN recombinant , împreună cu apariția metodelor de secvențiere a ADN-ului asistată de computer , a bioinformaticii și , acum, a tehnologiilor de secvențiere de ultimă generație , sunt responsabile pentru accelerarea rapidă experimentată de domeniul genomicii . Tehnologiile genomice s-au dezvoltat atât de rapid încât cercetarea biologică modernă trece în prezent printr - o adevărată revoluție genomică . În acest capitol, vom examina tehnologiile de bază utilizate în genomică, *apoi* vom analiza exemple de date genomice și vom discuta diferitele discipline care alcătuiesc genomica . De asemenea, vom discuta despre analiza *transcriptomului* . Capitolul va acoperi studiul genelor exprimate într - o celulă sau țesut („transcriptomul ") și proteomica , studiul proteinelor prezente într-o celulă sau țesut. Se va încheia cu o scurtă prezentare generală a *biologiei sistemelor* . O nouă arie a biologiei contemporane care încorporează și integrează genomica , analiza transcriptomului și datele proteomice. În capitolul 22 , vom continua studiul genomicii , prezentând numeroase aplicații - moderne ale ADN-ului recombinant și ale tehnologiilor genomice .

21.1

Secvențierea aleatorie a fragmentelor este o metodă utilizată pe scară largă pentru secvențierea și asamblarea genomurilor întregi.

Așa cum am explicat în Capitolul 20, tehnologia ADN-ului recombinant a făcut posibilă generarea de biblioteci de ADN care puteau fi utilizate pentru a identifica, clona și secvența gene specifice de interes. Cu toate acestea, o limitare majoră a tehnicilor de screening ale bibliotecilor și chiar a majorității tehnicilor bazate pe reacția în lanț a polimerazei (PCR) este că acestea pot identifica de obicei doar un număr mic de gene simultan. Genomica permite secvențierea genomurilor întregi. Genomica structurală se concentrează pe secvențierea genomului și pe analiza secvențelor de nucleotide pentru a identifica gene și alte secvențe importante, cum ar fi regiunile de reglare a genelor .

Cea mai utilizată strategie pentru secvențierea și asamblarea unui genom întreg se bazează pe diverse versiuni ale unei metode numite secvențiere rapidă , cunoscută și sub numele de clonare - aleatorie . Simplu spus, această tehnică este ca și cum tu și un prieten ați lua fiecare exemplarul acestui manual de genetică și ați rupe aleatoriu paginile în fâșii de aproximativ 10 până la 15 centimetri lungime. Fiecare capitol reprezintă un cromozom, iar toate literele din carte definesc „genomul". Tu și prietenul tău vă angajați apoi în sarcina plictisitoare de a compara fâșiile de hârtie pentru a găsi unde se suprapun și se potrivesc propozițiile - zone în care propoziții similare apar pe fâșii diferite . În cele din urmă, în teorie, multe dintre fâșiile care conțin propoziții potrivite se vor suprapune în așa fel încât ar putea fi folosite pentru a reconstrui paginile și ordinea corectă a întregului text.

Figura 21.1 prezintă o prezentare generală a metodei de secvențiere a întregului genom prin forță brută. Mai întâi, un cromozom întreg este tăiat în fragmente scurte, suprapuse, fie prin tăierea mecanică a ADN -ului într -un fel (de exemplu, prin tratament termic excesiv sau prin sonicare, folosind energia sonoră pentru a rupe ADN-ul), fie prin utilizarea enzimelor de restricție pentru a tăia ADN-ul în diferite locuri. Pentru simplitate, prezentăm aici un exemplu de bază de tăiere a ADN-ului folosind enzime de restricție. Din ce în ce mai mult, se utilizează metode neenzimatice pentru a tăia ADN-ul, în special în unele dintre tehnicile de secvențiere de generație următoare. Reamintim din Capitolul 20 că enzimele de restricție sunt enzime care digeră ADN-ul și care taie catena fosfodiesteric a ADN-ului la secvențe specifice. Pot fi utilizate diferite enzime de restricție, astfel încât cromozomii să fie tăiați în locuri diferite; sau, uneori, se utilizează digestii parțiale ale ADN-ului cu o singură enzimă de restricție. În cazul digestiilor parțiale, ADN-ul este incubat cu enzime de restricție pentru o perioadă scurtă de timp, astfel încât enzima individuală să nu taie complet toate locurile corespunzătoare unei secvențe specifice. În ambele cazuri , digestia cromozomilor întregi cu enzime de restricție generează mii sau milioane de fragmente de ADN suprapuse. De exemplu , un dispozitiv de tăiere cu 6 perechi de baze, cum ar fi EcoRI, creează aproximativ 700.000 de fragmente dacă este utilizat pentru a digera genomul uman. Deoarece aceste fragmente suprapuse sunt segmente contigue care formează colectiv o moleculă continuă de ADN în cadrul unui cromozom, ele sunt numite fragmente contigue sau „contige".

În secțiunea următoare, vom vedea importanța bioinformaticii în genomică. Una dintre primele aplicații bioinformatice dezvoltate în scopuri genomice a fost utilizarea programelor bazate pe algoritmi pentru alinierea secvențelor de ADN , în care secvențe de baze similare, numite contig-uri, sunt aliniate pentru comparație. Această aliniere identifică secvențele care se suprapun, permițând oamenilor de știință să reconstruiască ordinea lor în cadrul unui cromozom. Figura 21.2 prezintă un exemplu de aliniere și asamblare a contig-urilor pentru o porțiune a cromozomului 2 uman. Pentru simplitate, această figură prezintă secvențe relativ scurte pentru fiecare contig, deși în realitate ar fi mult mai lungi. Figura este, de asemenea, simplificată prin faptul că , în alinierile reale , secvențele asamblate nu se suprapun întotdeauna doar la capetele lor.

Tehnica de secvențiere a unui genom întreg folosind fragmente selectate aleatoriu a fost dezvoltată de J. Craig Venter și colegii săi de la *Institutul pentru Cercetarea Genomului* (TIGR). În 1995, oamenii de știință de la TIGR au folosit această tehnică pentru a secvența genomul de 1,83 milioane de perechi de baze al bacteriei *Haemophilus influenzae.* Aceasta a fost prima secvență genomică completă pentru un organism liber și a oferit o „dovadă a conceptului" indicând faptul că secvențierea fragmentelor selectate aleatoriu ar putea fi utilizată pentru a secvența un genom întreg . Chiar și după *secvențierea genomului H. influenzae,* mulți oameni de știință au fost sceptici că tehnica bazată pe fragmente selectate aleatoriu ar putea funcționa cu genomurile eucariote mai mari . Dar astăzi , variante ale tehnicilor de secvențiere a fragmentelor selectate aleatoriu sunt...

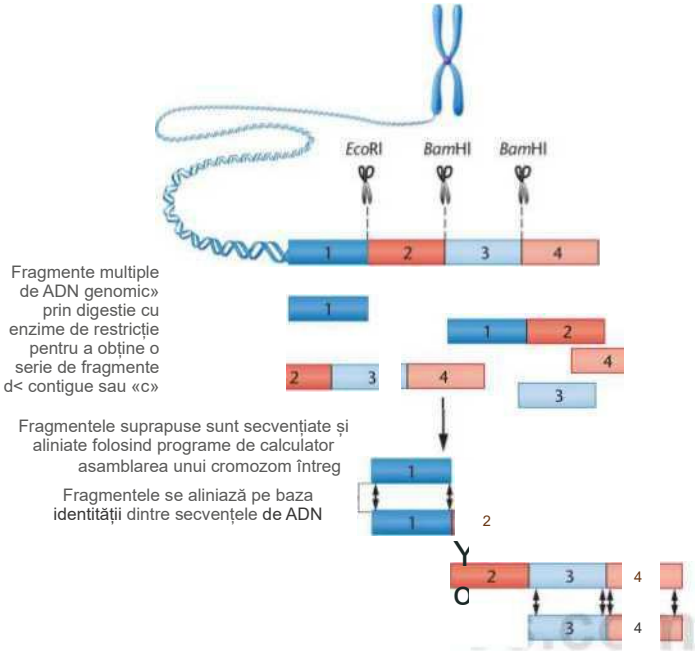
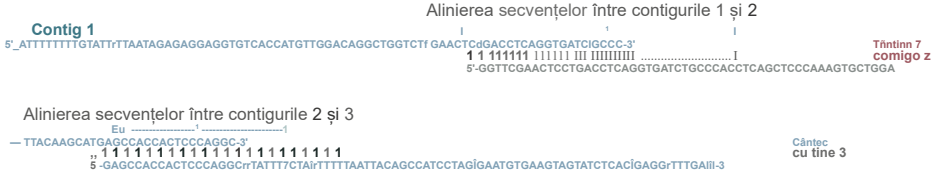

EcoRI
BamHI
BamHI
1
2
3
4
Fragmente multiple de ADN genomic» prin digestie cu enzime de restricție pentru a obține o serie de fragmente d< contigue sau «c»
Fragmentele suprapuse sunt secvențiate și aliniate folosind programe de calculator asamblarea unui cromozom întreg
Fragmentele se aliniază pe baza identității dintre secvențele de ADN

FIGURA 21.1 Prezentare generală a secvențierii și asamblării prin fragmente selectate aleatoriu ale unui genom întreg. Această tehnică se bazează pe o strategie care utilizează enzime de restricție pentru a digera ADN-ul genomic într- o serie de contig-uri, care sunt apoi secvențiate și aliniate folosind tehnici bioinformatice pentru a identifica fragmentele suprapuse pe baza identității secvenței . Rețineți că digestia EcoRI a porțiunii de ADN prezentată în figură produce două fragmente (contig-urile 1, 2 și 4), în timp ce digestia fiara HI produce trei fragmente (contig-urile 1-2, 3 și 4).


Alinierea secvențelor între contigurile 1 și 2
Contig 1
5'_ATTTTTTTTGTATTrTTAATAGAGAGGAGGTGTCACCATGTTGGACAGGCTGGTCTf GAACTCdGACCTCAGGTGATCIGCCC-3'
1 1 111111 111111 III IIIIIIIII I
5'-GGTTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCCACCTCAGCTCCCAAAGTGCTGGA
Tîntinn 7
comigo z
Alinierea secvențelor între contigurile 2 și 3
Eu
— TTACAAGCATGAGCCACCACTCCCAGGC-3'
,, 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
5 -GAGCCACCACTCCCAGGCrrTATTT7CTAIrTTTTTAATTACAGCCATCCTAGÎGAATGTGAAGTAGTATCTCACÎGAGGrTTTGAIII-3
Cântec
cu tine 3

Secvență asamblată corespunzătoare unui segment parțial al cromozomului 2 și bazată pe alinierea a trei contig-uri

5'-ATTTTTTTTGTATTTTTAATAGAGACGAGGTGTCACCATGTTGGACAGGCTGGTCTGAACTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCCACCTCACGCCTCCCAAAGTGCTGGA
TTACAAGCATGAGCCACCACTCCCAGGCTTTATTTTCTATTTTTTTAATTACAGCCATCCTAGTGAATGTGAAGTAGTATCTCACTGAGGTTTTGATTT-3'

FIGURA 21.2 Alinierea secvențelor de ADN ale contigurilor corespunzătoare cromozomului 2 uman. ADN-ul monocatenar pentru trei contiguri diferite ale cromozomului 2 uman este prezentat în albastru, roșu și verde. Figura include secvența reală a cromozomului 2, dar în realitate, alinierea contigurilor se realizează cu fragmente care au câteva mii de baze lungime. Alinierea celor trei contiguri permite asamblarea unei porțiuni din cromozomul 2. Alinierea tuturor contigurilor corespunzătoare unui anumit cromozom ar permite asamblarea unui cromozom complet secvențiat.

Metodele predominante de secvențiere a genomurilor, inclusiv cele ale *Drosophilei,* câinelui, câtorva sute de specii de bacterii, oamenilor și multor alte organisme, așa cum vom vedea mai târziu în capitol.

Separarea unui genom într-o serie de contig-uri nu este deosebit de dificilă; cu toate acestea, unul dintre principalele obstacole de depășit în secvențierea unui genom complet a fost modul de a secvenția milioane sau miliarde de perechi de baze rapid și ieftin. Aceasta a fost una dintre principalele provocări pentru oamenii de știință care lucrau la Proiectul Genomului Uman (Secțiunea 21.4). Metoda de secvențiere Sanger descrisă în Capitolul 20 a fost tehnica de secvențiere predominantă pentru o lungă perioadă de timp; cu toate acestea, una dintre principalele limitări ale acestei tehnici a fost că până și cele mai bune geluri de secvențiere au produs doar câteva sute de perechi de baze per rulare și doar câteva rulări puteau fi efectuate într-o singură zi, astfel încât producția generală de date secvențiale a fost foarte lentă în comparație cu tehnicile moderne. Evident, secvențierea manuală a unui genom complet folosind metoda Sanger ar fi foarte lentă. Principalul progres tehnologic care a făcut posibilă genomica a fost dezvoltarea secvențiatoarelor computerizate automate.

Secvențierea de mare randament și impactul acesteia asupra genomicii

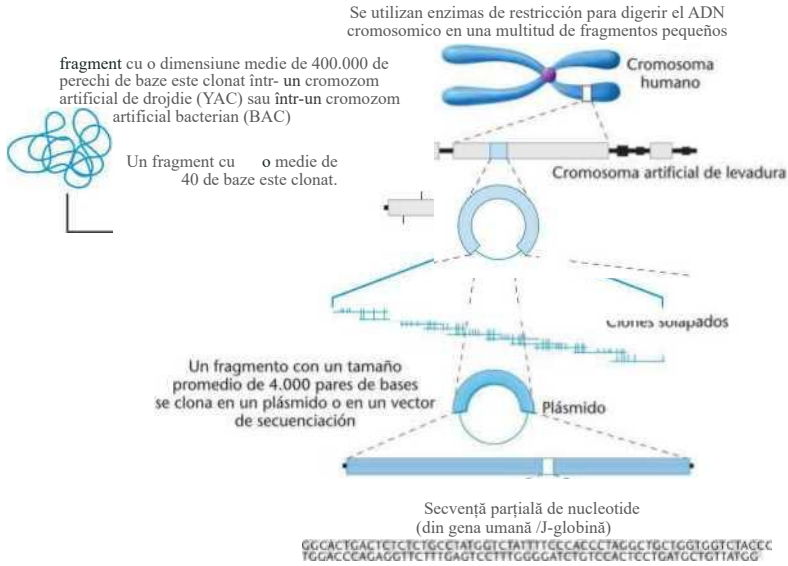
Așa cum s-a explicat în Capitolul 20, primele instrumente de secvențiere a ADN-ului bazate pe computer au folosit - dideoxinucleotide (ddNTP) marcate cu coloranți fluorescenți (a se vedea Figura 20.16). S-a folosit un singur tub de reacție, iar amestecurile de reacție pentru secvențiere au fost separate într-un gel de poliacrilamidă cu diametrul ultrasubțire într-un tub, numit gel capilar . Pe măsură ce fragmentele de ADN se deplasau prin gel, acestea erau detectate de un fascicul laser. Laserul stimula colorantul fluorescent de pe fiecare fragment de ADN, determinând ddNTP-urile încorporate în lanțurile de ADN nou sintetizate să emită lumină la diferite lungimi de undă . Lumina emisă a fost captată de un detector, care a amplificat semnalul și apoi a trimis aceste informații către un computer pentru procesare și conversie în secvența de ADN .

Multe dintre primele secvențiatoare automatizate de computer, concepute pentru ceea ce se numea secvențiere de mare randament, puteau procesa milioane de perechi de baze într-o singură zi. Aceste secvențiatoare conțineau mai multe geluri capilare lungi de câteva zeci de centimetri. Unele dintre aceste secvențiatoare puteau găzdui până la 96 de geluri capilare simultan, fiecare producând aproximativ 900 de baze de secvență . Deoarece aceste secvențiatoare erau automatizate de computer , puteau funcționa toată ziua , generând peste două milioane de baze de secvență zilnic. În ultimii 10 ani , secvențierea de mare randament a crescut productivitatea tehnologiei de secvențiere a ADN-ului de peste 500 de ori. Numărul total de baze care puteau fi secvențiate într-o singură reacție se dubla aproximativ la fiecare 24 de luni. În același timp , această creștere a eficienței a dus la o reducere uriașă a costurilor , de la 1,00 USD la mai puțin de 0,001 USD per pereche de baze . După cum vom vedea în Secțiunea 21.4, dezvoltarea - secvențierii de mare randament a fost , fără îndoială, esențială pentru succesul Proiectului Genomului Uman . Și, așa cum am văzut în Capitolul 20, secvențiatoarele de nouă generație permit acum oamenilor de știință care studiază genomul să producă secvențe de aproape 50.000 de ori mai rapid decât secvențiatoarele disponibile în anul 2000, cu o cantitate mai mare de date de ieșire, o precizie îmbunătățită și un cost mai mic.

Tehnica clonă-clonă

Înainte ca tehnicile de secvențiere a întregului genom să devină răspândite , genomurile au fost asamblate folosind o tehnică clonă cu clonă , numită și clonare prin cartografiere (Figura 21.3). Progresele timpurii în cadrul Proiectului Genomului Uman s-au bazat pe această metodologie , în care fragmentele individuale de ADN rezultate din digestia cromozomilor cu enzime de restricție au fost aliniate pentru a crea hărți de restricție ale unui cromozom. Aceste fragmente de restricție au fost apoi ligate în vectori, cum ar fi cromozomi artificiali bacterieni (BAC) sau cromozomi artificiali de drojdie (YAC) , pentru a crea biblioteci de cromozomi contigui. Reamintim din Capitolul 20 că BAC-urile și YAC-urile sunt vectori de clonare potriviți pentru replicarea fragmentelor mari de ADN . Adesea , au fost preparate biblioteci corespunzătoare cromozomilor individuali .

Înainte de dezvoltarea tehnicilor de mare randament capabile să secvențieze câteva mii de baze într-o singură rundă, fragmentele de ADN de pe cromozomii BAC și YAC erau adesea digerate în fragmente mai mici , mai ușor de manipulat , care erau apoi subclonate în cosmide sau plasmide pentru secvențiere completă (Figura 21.3). După secvențierea fiecărui fragment și efectuarea analizei pentru detectarea alinierilor suprapuse , se putea asambla un cromozom . Tehnicile bioinformatice discutate în secțiunea - următoare au făcut posibilă identificarea potențialelor gene care codifică proteine și atribuirea unei locații pe cromozom . De exemplu, Figura 21.3 prezintă utilizarea ...


Se utilizan enzimas de restricción para digerir el ADN cromosomico en una multitud de fragmentos pequeños
fragment cu o dimensiune medie de 400.000 de perechi de baze este clonat într- un cromozom artificial de drojdie (YAC) sau într-un cromozom artificial bacterian (BAC)
Un fragment cu o medie de 40 de baze este clonat.
Cromosoma humano
Cromosoma artificial de levadura
Un fragmento con un tamaño promedio de 4.000 pares de bases se clona en un plásmido o en un vector de secuenciación
Plásmido
Secvență parțială de nucleotide (din gena umană /J-globină)
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATGGTCTATTTTCCCACCCTAGGCTGCTGGTGGTCTACCC
TGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGG

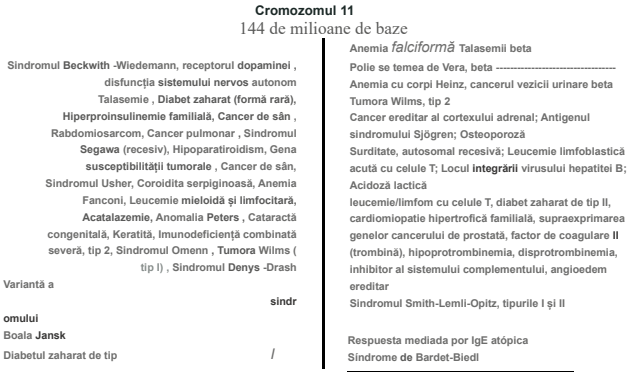

Cromozomul 11
144 de milioane de baze
Sindromul Beckwith -Wiedemann, receptorul dopaminei , disfuncția sistemului nervos autonom Talasemie , Diabet zaharat (formă rară), Hiperproinsulinemie familială, Cancer de sân , Rabdomiosarcom, Cancer pulmonar , Sindromul Segawa (recesiv), Hipoparatiroidism, Gena susceptibilității tumorale , Cancer de sân, Sindromul Usher, Coroidita serpiginoasă, Anemia Fanconi, Leucemie mieloidă și limfocitară, Acatalazemie, Anomalia Peters , Cataractă congenitală, Keratită, Imunodeficiență combinată severă, tip 2, Sindromul Omenn , Tumora Wilms (tip I) , Sindromul Denys -Drash
Variantă a
sindr
omului
Boala Jansk
Diabetul zaharat de tip
/
Anemia falciformă Talasemii beta
Polie se temea de Vera, beta ----------
Anemia cu corpi Heinz, cancerul vezicii urinare beta
Tumora Wilms, tip 2
Cancer ereditar al cortexului adrenal; Antigenul sindromului Sjögren; Osteoporoză
Surditate, autosomal recesivă; Leucemie limfoblastică acută cu celule T; Locul integrării virusului hepatitei B; Acidoză lactică
leucemie/limfom cu celule T, diabet zaharat de tip II, cardiomiopatie hipertrofică familială, supraexprimarea genelor cancerului de prostată, factor de coagulare II (trombină), hipoprotrombinemia, disprotrombinemia, inhibitor al sistemului complementului, angioedem ereditar
Sindromul Smith-Lemli-Opitz, tipurile I și II
Respuesta mediada por IgE atópica
Sindrome de Bardet-Biedl

FIGURA 21.3 O tehnică clonă cu clonă sau de cartografiere pentru secvențierea genomului implică clonarea fragmentelor de ADN care se suprapun (contige) într-o serie de vectori. Se utilizează diferiți vectori, cum ar fi cromozomii BAC și YAC, cosmidele și plasmidele, în funcție de dimensiunea fiecărui fragment de ADN analizat. Clonele care se suprapun sunt apoi secvențiate și aliniate pentru a asambla un cromozom complet.

maparea clonării la o parte a secvenței cromozomului 11, inclusiv o parte a genei λ -globinei umane.

Comparativ cu secvențierea întregului genom , secvențierea clonă cu clonă este foarte greoaie și consumatoare de timp din cauza timpului necesar pentru clonarea fragmentelor de ADN în vectori diferiți, transformarea bacteriilor sau drojdiilor, selectarea clonelor individuale din biblioteca de gene pentru secvențiere și apoi efectuarea analizei secvențelor și asamblarea unor secvențe relativ scurte . În esență, secvențierea clonă cu clonă implică secvențierea organizată a clonelor dintr -o hartă de restricție, mai degrabă decât secvențierea aleatorie urmată de asamblare. Deoarece tehnicile de secvențiere a întregului genom au devenit metoda mai comună de asamblare a genomului, metodele de cartografiere a clonării sunt acum utilizate în principal pentru a aborda problemele întâlnite adesea în timpul secvențierii întregului genom. De exemplu, secvențele extrem de repetitive dintr-un genom pot fi dificil de aliniat corect atunci când se identifică suprapunerile, deoarece cu astfel de secvențe este imposibil să se fie sigur dacă părțile aproape identice sunt fragmente care se suprapun sau aparțin unor părți diferite ale unui cromozom extrem de repetitiv. De asemenea, întâlnim frecvent lacune între contigurile aliniate. Folosind analogia cu reconstrucția unei cărți, după compararea tuturor fâșiilor de hârtie, s-ar putea să rămânem cu unele foarte mici, care conțin prea puține cuvinte pentru a se potrivi în siguranță cu oricare altele, precum și cu alte fragmente pentru care pur și simplu nu există nicio modalitate de a găsi o potrivire. În astfel de cazuri, o tehnică de secvențiere clonă cu clonă ne poate permite să asamblăm contigurile necesare și să completăm cromozomul. Prin urmare, atunci când secvențiem un genom, secvențierea întregului genom este adesea combinată cu secvențierea prin cartografiere.

Secvențe de schițe și verificarea erorilor

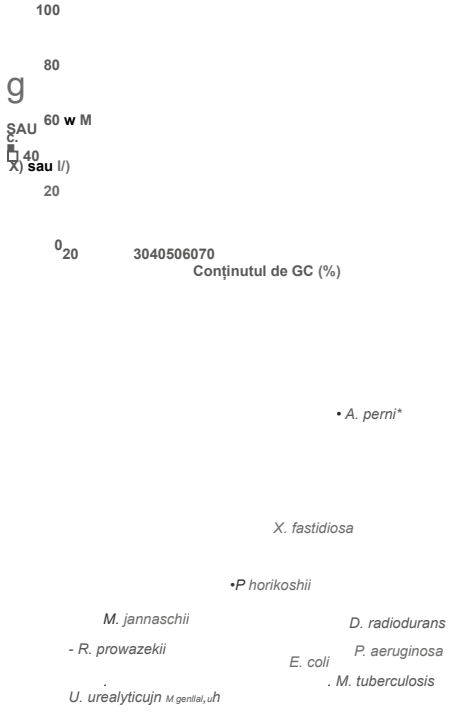
Este destul de comun ca disponibilitatea unei secvențe de genom în stadiu de proiect să fie anunțată cu câțiva ani înainte de publicarea secvenței finale . Secvențele în stadiu de proiect conțin adesea lacune în anumite zone care au fost dificil de analizat din diverse motive. Decizia de a desemna o secvență drept „finală" este dictată de numărul maxim de erori pe care oamenii de știință specializați în genom sunt dispuși să le accepte.

Segmentele cromozomiale sunt adesea secvențiate de mai multe ori pentru a asigura un nivel ridicat de precizie. Asamblarea unei secvențe genomice finale din procese multiple de secvențiere este cunoscută sub numele de compilare . O modalitate de a compila un genom și de a verifica erorile este de a secvenția separat catenele complementare ale unei molecule de ADN și apoi de a utiliza reguli de împerechere a bazelor pentru a verifica erorile. Într-un caz, cercetătorii care au utilizat metoda de secvențiere aleatorie cu genomul bacteriei Pseudomonas *aeruginosa* au secvențiat cele 6,3 milioane de nucleotide de șapte ori pentru a se asigura că secvența finală era precisă. Dar chiar și cu acest grad de redundanță, software-ul de asamblare a detectat 1.604 regiuni care necesitau clarificări suplimentare. Acest lucru a necesitat...

ACUM REZOLVĂ ASTA |

21.1 Pentru a aborda problemele legate de adnotarea corectă a genomurilor microbiene, Marie Skovgaard și colegii săi (2001. *Trends Genet.* **17: 425-428) au comparat numărul adnotat de gene din genomurile obținute din analiza secvențelor cu numărul de proteine cunoscute din fiecare organism, așa cum sunt conținute într-o bază de date cu proteine. Graficul următor rezumă rezultatele studiului lor. Erorile variază de la un procent mic pentru A4.** *genitalium* **la aproape 100% pentru** *A. per ni**. **Tendința generală prezentată în grafic este că rata de eroare crește pe măsură ce conținutul de GC al genomului crește. Ce ar putea explica acest lucru? Ce precauții ar trebui luate la adnotarea genomurilor cu conținut ridicat de GC?**

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm relația dintre conținutul GC al unui genom și rata de eroare a procesului de adnotare . Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a potențialelor provocări cu care ne confruntăm atunci când aliniem contigurile bogate în GC sau orice secvență cu o abundență de baze repetitive.*



urmează să fie reanalizat și secvențiat. În final, părțile relevante ale secvenței obținute folosind fragmente selectate aleatoriu au fost comparate cu secvențele a două regiuni genomice larg separate, obținute prin clonare convențională. Cele 81.843 de nucleotide clonate și secvențiate folosind metoda de secvențiere clonă cu clonă au fost în perfectă concordanță cu secvența obținută prin metoda fragmentelor selectate aleatoriu. Acest nivel de atenție în verificarea acurateței secvențelor nu este neobișnuit; precauții similare sunt luate în aproape toate proiectele genomice.

Odată compilat, un genom este analizat pentru a identifica - secvențele genetice, elementele de reglare și alte caracteristici care dezvăluie informații importante. În secțiunea următoare, vom discuta rolul fundamental pe care îl joacă bioinformatica în acest proces.

21.2

Analiza secvențelor de ADN se bazează pe aplicații bioinformatice și baze de date genomice.

Genomica a necesitat dezvoltarea rapidă a bioinformaticii, care este utilizarea hardware-ului și software-ului, împreună cu aplicații matematice, pentru a organiza , partaja și analiza date legate de - structura genelor , secvența și expresia genelor și structura și funcția proteinelor. Cu toate acestea, chiar înainte de începerea proiectelor de secvențiere a întregului genom, o cantitate vastă de informații despre secvențe de la diferite organisme se acumula deja ca urmare a clonării genelor folosind tehnici de ADN recombinant . Oamenii de știință din întreaga lume aveau nevoie de baze de date care să poată fi utilizate pentru a stoca, partaja și recupera cât mai multe informații posibil despre secvențele de ADN și proteine. Prin urmare, software-ul bioinformatic era deja utilizat pe scară largă pentru a compara și analiza secvențele de ADN pentru a crea baze de date atât private, cât și publice . Cu toate acestea, odată ce genomica a apărut ca o nouă tehnică de analiză a ADN-ului , bioinformatica a devenit și mai importantă decât înainte. Astăzi , aceasta constituie un domeniu foarte dinamic al cercetării biologice, oferind noi oportunități profesionale tuturor persoanelor interesate să combine înțelegerea datelor biologice , tehnologiile informației, matematica și analiza statistică.

Printre cele mai importante aplicații ale bioinformaticii se numără compararea secvențelor de ADN, ca în cazul alinierii contigue discutate în secțiunea anterioară; identificarea genelor în cadrul unei secvențe de ADN genomice; localizarea regiunilor reglatoare ale genelor , cum ar fi promotorii și intensificatorii ; identificarea secvențelor structurale în cromozomi, cum ar fi secvențele telomerice; predicția secvenței de aminoacizi a unui polipeptid presupus codificat de o secvență genetică clonată; analiza structurii proteinelor și predicția funcțiilor proteinelor , pe baza motivelor și domeniilor identificate ; și deducerea relațiilor evolutive dintre gene și organisme din informațiile secvenței genomice .

Tehnicile de secvențiere de mare randament s-au dezvoltat aproape simultan cu extinderea internetului . Pe măsură ce datele genomice s-au acumulat, multe baze de date cu secvențe de ADN au devenit disponibile publicului online . Bazele de date sunt esențiale pentru arhivarea datelor și partajarea acestora cu alți cercetători și cu publicul . Una dintre cele mai importante baze de date genomice , numită GenBank , este întreținută de *Centrul Național pentru Informații Biotehnologice* (NCBI) din Washington, D.C., și este cea mai mare bază de date de secvențe de ADN disponibilă publicului. GenBank partajează și achiziționează date din baze de date din Japonia și Europa; conține peste 100 de miliarde de baze corespunzătoare a peste 100.000 de specii; iar dimensiunea sa se dublează la fiecare 14-18 luni ! Comitetul pentru Nomenclatura Genomului Uman , susținut de NIH , stabilește reguli pentru atribuirea de nume și simboluri genelor umane nou clonate . Pe măsură ce secvențele sunt identificate și genele sunt denumite, fiecărei secvențe depuse în GenBank i se atribuie un număr de acces pe care oamenii de știință îl pot utiliza pentru a accesa și extrage acea secvență pentru analiză .

NCBI este o sursă valoroasă de baze de date accesibile publicului și instrumente bioinformatice pentru analiza datelor genomice. Am prezentat deja cititorilor NCBI și GenBank în mai multe exerciții din secțiunile „Explorarea genomicii" . În secțiunea „Explorarea genomicii " a acestui capitol, vom folosi NCBI și GenBank pentru a compara și alinia contigurile în vederea asamblării unui segment cromozomial .

Adnotare pentru identificarea secvențelor genetice

Una dintre provocările fundamentale ale genomicii este că, deși proiectele genomice generează cantități enorme de informații despre secvențele de ADN, aceste date sunt de puțin folos până când nu sunt analizate și interpretate.

Proiectele genomice sunt dedicate acumulării de secvențe de nucleotide, iar apoi oamenii de știință trebuie să dea un sens acestor secvențe. Astfel, după secvențierea și compilarea unui genom, oamenii de știință se confruntă cu sarcina de a identifica secvențele de reglare a genelor și alte secvențe de interes din cadrul genomului pentru a dezvolta hărți genetice. Acest proces, numit adnotare, depinde în mare măsură de bioinformatică și există un număr mare de instrumente software disponibile pentru a-l realiza.

O tehnică inițială pentru adnotarea unei secvențe implică compararea ADN-ului genomic nou secvențiat cu secvențe cunoscute deja stocate în diverse baze de date. NCBI oferă acces la BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), o aplicație software populară pentru căutarea în baze de date de secvențe de ADN și proteine. Folosind BLAST, putem compara un segment de ADN genomic cu secvențe stocate în diverse baze de date majore , cum ar fi GenBank, pentru a identifica porțiunile care se potrivesc sau se aliniază cu secvențele existente. Figura 21.4 prezintă un exemplu reprezentativ de aliniere a secvențelor bazată pe o căutare BLAST. În acest exemplu, un contig de 280 pb din cromozomul 12 de șobolan a fost utilizat pentru a căuta într-o bază de date de șoareci pentru a determina dacă secvența contigului de șobolan se potrivește cu vreo genă cunoscută de șoarece . Rețineți că contigo-ul de șobolan (secvența de interogare în căutarea BLAST) se aliniază cu perechile de baze 174.612 până la 174.891 din cromozomul 8 de șoarece. Numărul de acces pentru secvența cromozomului de șoarece , NT_039455.6, este afișat în partea de sus a figurii. Căutările BLAST calculează un scor de similaritate - numit și valoare de identitate - care este determinat prin însumarea potrivirilor identice dintre secvențele aliniate și împărțirea la numărul total de baze aliniate. Lacunele indică bazele care lipsesc din cele două secvențe și sunt de obicei ignorate la calcularea scorurilor de similaritate . Secvențele aliniate de șobolan și șoarece au avut o similaritate de 93 % și nu au prezentat lacune în aliniere . Rețineți că raportul BLAST oferă și o valoare „Așteptată" sau E, care indică numărul de potriviri dintre secvențele aliniate care ar fi așteptate din cauza aleatoriei simple . Alinierile semnificative , care indică faptul că secvențele de ADN sunt semnificativ similare, au valori E mai mici de 1,0 .

Întrucât știm că această secvență de pe cromozomul 8 de șoarece conține o genă a receptorului de insulină (care codifică o proteină ce se leagă de hormonul insulină), este foarte probabil ca și secvența comigo de șobolan să conțină o genă a receptorului de insulină . Vom reveni la subiectul asemănărilor în secțiunile 21.3 și 21.6 ,

ref | NT.039455.6 | Mm8_39495_36
Mus musculus chromosome 8 genomic contig, strain
C57BL/6] Features in this part of subject sequence: insulin
receptor Score = 418 bits (226), Expect = 2e-l 14
Identities = 262/280 (93%), Gaps = 0/280 (0%)

```
Query   1          CAGGCCATCCCGAAAGCGAAGATCCCTTGAAGAGGTGGGCAATGTGACAGCCACTACACC 60
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| | | |
```

unde vom discuta despre modul în care similaritatea dintre -secvențele genetice poate fi utilizată pentru a deduce funcția genelor și pentru a identifica gene înrudite evolutiv prin genomică comparativă.

Trăsăturile distinctive ale unei secvențe genetice pot fi recunoscute în timpul adnotării.

Una dintre principalele limitări ale acestei tehnici de adnotare este că funcționează numai dacă există deja secvențe genetice similare într-o bază de date. Din fericire, aceasta nu este singura modalitate de a identifica genele. Indiferent dacă genomul pe care îl studiem provine de la o eucariotă sau de la o procariotă, diverse caracteristici genetice distinctive pot fi căutate folosind software bioinformatic (Figura 21.5). Am discutat deja aceste caracteristici ale unei gene „tipice" în capitolele 13 și 17. De exemplu, secvențele de reglare a genelor pe care le putem găsi în amonte de gene sunt marcate de secvențe identificabile, cum ar fi promotori, amplificatori și amortizori. Reamintim din capitolul 17 că secvențele TATA box, GC box și CAAT box sunt de obicei prezente în regiunea promotorului genelor eucariote . Rețineți, de asemenea, că situsurile de clivaj dintre exoni și introni conțin o secvență previzibilă (majoritatea intronilor încep cu GT și se termină cu AG), iar aceste secvențe ale situsurilor de clivaj sunt cruciale în determinarea limitelor dintre introni și exoni. Interesant este că estimările actuale indică faptul că doar șase procente din genele umane sunt transcrise dintr-un singur segment liniar de ADN care nu conține introni.

, importante pentru adnotare (Figura 21.5) sunt elementele din aval, cum ar fi secvențele de terminare și secvențele bine definite situate la capătul unei gene, unde o secvență de poliadenilare semnalează adăugarea unei cozi poli -A la capătul 3' al unui -transcript de ARNm. Sarcina de adnotare poate fi uneori oarecum mai ușoară pentru genele procariote decât pentru genele eucariote , deoarece genelor procariote le lipsesc introni. Programele de predicție a genelor sunt utilizate pentru a adnota secvența . Aceste programe încorporează elemente de căutare pentru multe dintre criteriile menționate mai sus și au devenit aplicații valoroase ale bioinformaticii .

Totuși , chiar și cu bioinformatica , identificarea unei gene într-o secvență specifică de ADN nu este întotdeauna simplă , în special atunci când se studiază gene care nu codifică proteine . De fapt, o întrebare rezonabilă ori de câte ori este secvențiat un genom este : „ Unde sunt genele?". Cu alte cuvinte , cum știm care secvențe dintr -un genom sunt gene și care nu sunt nici gene , nici parte a unei gene? Luați în considerare secvența prezentată în Figura 21.6 (a), care prezintă o porțiune din genomul uman . La prima vedere , nu este clar dacă această secvență conține gene și , dacă da, câte . Cu toate acestea , analiza secvenței relevă mai multe caracteristici identificabile care oferă indicii despre prezența unei gene care codifică proteine . În plus, genele care codifică proteine conțin una sau mai multe secvențe triplet de tip cadru de citire deschis (ORF) care , după transcripția și splicing -ul ARNm , sunt traduse în secvența de aminoacizi a unei proteine . ORF-urile încep de obicei cu o secvență de inițiere , de obicei ATG, care este transcrisă în codonul de început AUG al unei molecule de ARNm și se termină cu o secvență de terminare TAA, TAG sau TGA, care corespunde codonilor de oprire UAA, UAG și UGA ai ARNm. Informația genetică este codificată în grupuri de câte trei nucleotide (tripleți), dar nu este întotdeauna clar de unde să începem analizarea unei secvențe , nici...

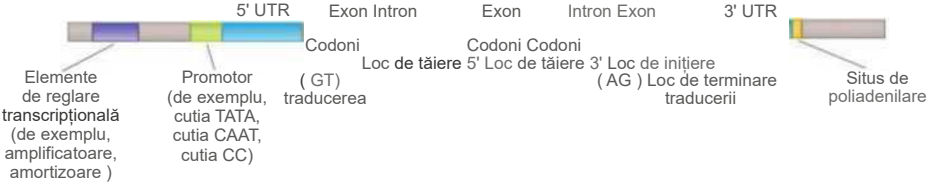

5' UTR
Exon Intron
Exon
Intron Exon
3' UTR
Codoni
Codoni Codoni
Loc de tăiere 5' Loc de tăiere 3' Loc de inițiere
(AG) Loc de terminare traducerii
(GT) traducerea
Elemente de reglare transcripțională (de exemplu, amplificatoare, amortizoare)
Promotor (de exemplu, cutia TATA, cutia CAAT, cutia CC)
Situs de poliadenilare

FIGURA 21.5 Caracteristicile unei gene care codifică proteine și care pot fi utilizate în timpul adnotării pentru a identifica o genă într -o secvență necunoscută de ADN genomic . Majoritatea genelor eucariote sunt organizate în segmente codificatoare (exoni) și segmente necodificatoare (introni). Atunci când se adnotează o secvență genomică pentru a determina dacă aceasta conține o genă, este necesar să se facă distincția între introni și exoni, secvențe de reglare a genelor, cum ar fi promotorii și amplificatorii, regiuni netraduse (UTR) și secvențe de terminare a genelor .

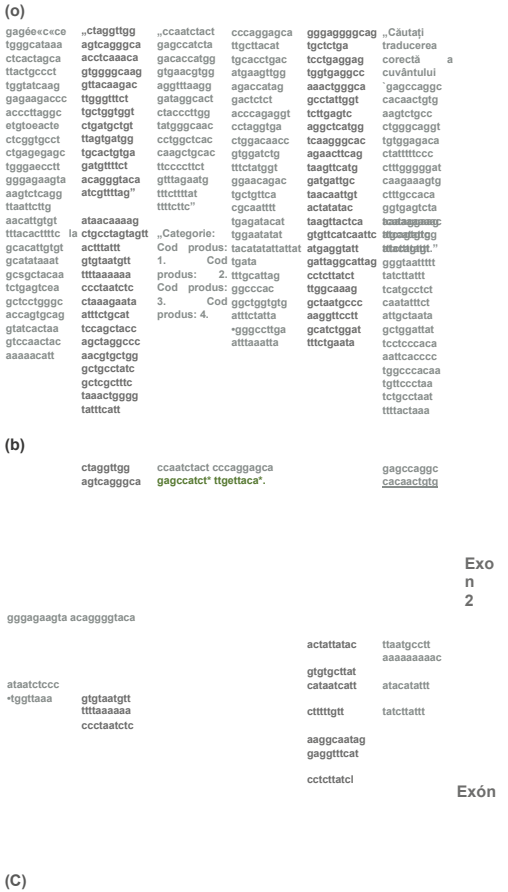
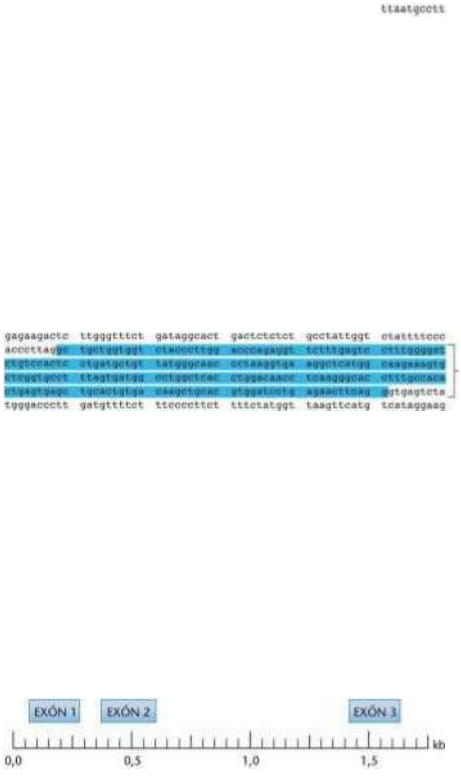

(o)
„ctaggttgg agtcagggca acctcaaaca gtgggacaag gttacaagac ttgggtttct tgctggtggt ctgatgctgt ttagtgatgg tgcactgtga gatgtttttct acagggtaca atcgttttag" ataacaaaag ctgcctagtagtt actttattt gtgtaatgtt ctttaaaaaa ccctaatctc atttctgcat tccagctacc agctaggccc aacgtgctgg gctgcctatc gctcgctttc taaactgggg tatttcatt
„ccaatctact gagccatcta gacaccatgg gtgaacgtgg aggtttaagg gataggcact ctacccttgg tatgggcaac cctggctcac caagctgcac ttcccctct gtttagaatg tttcttttat ttttcttc"
„Categorie: Cod produs: 1. Cod produs: 2. Cod produs: 3. Cod produs: 4.
cccaggagca ttgcttacat tgcacctgac atgaagttgg agaccatag gactctct acccagaggt cctaggtga ctggacaacc gtggatctg tttctatggt ggaacagac tgctgttca cgcaatttt tgagatacat tggaatatat tacatatattattat tgata tttgcattag ggcccac ggctggtgtg atttctatta •gggccttga atttaaatta
gggaggggcag tgctctga tcctgaggag tggtgaggcc aaactgggca gcctattggt tcttgagtc aggctcatgg tcaagggcac agaacttcag taagttcatg gatgattgc taacaattgt actatatac taagttactca gtgttcatcaattc atgaggtatt gattaggcattag cctcttatct ttggcaaag gctaatgccc aaggttcctt gcatctggat tttctgaata
„Căutați traducerea corectă a cuvântului `gagccaggc cacaactgtg aagtctgcc ctgggcaggt tgtggagaca ctatttttccc ctttgggggat caagaaagtg ctttgccaca ggtgagtcta gagccaggc cacaactgtg."
gggtaattttt tatcttattt tcatgcctct caatatttct attgctaata gctggattat tcctcccaca aattcacccc tggcccacaa tgttccctaa tctgcctaat ttttactaaa
(b)
ctaggttgg agtcagggca
ccaatctact cccaggagca gagccatct* ttgettaca*.
gagccaggc cacaactgtg
Exon 2
gggagaagta acaggggtaca
actattatac gtgtgcttat cataatcatt cttttgtt aaggcaatag gaggtttcat cctcttatcl
ttaatgcctt aaaaaaaaac atacatattt tatcttattt
ataatctccc •tggttaaa gtgtaatgtt ttttaaaaaa ccctaatctc
Exón
(C)

FIGURA 21.6 Adnotarea unei secvențe de ADN care conține o parte din gena β-globinei umane . Prin convenție, secvența este prezentată în grupuri de câte zece nucleotide, deși în realitate secvența este continuă. (a) Poziția genelor în această secvență, dacă există , nu este evidentă prin examinare superficială . (b) Secvența analizată arată poziția unei secvențe de reglare din amonte (verde). Caseta roșie indică un triplet de început , reprezentând un codon de început în ARNm. Cadrele de citire deschise pentru trei exoni ai genei β-globinei umane sunt prezentate în albastru .
(c) Diagramă care prezintă cei trei exoni (exonii 1, 2 și 3) ai genei β-globinei umane codificate de secvența prezentată în (a).



Prin urmare, care nucleotidă este prima, care este a doua și care este a treia. În mod normal, secvența adiacentă unui promotor este examinată pentru un triplet de început ; cu toate acestea, putem folosi ORF-uri pentru a identifica o genă chiar și atunci când nu putem localiza o secvență de promotor. Programele software pot apoi analiza ORF -urile câte trei nucleotide odată . Descoperirea unei ORF-uri care începe cu un ATG și este urmată la o anumită distanță de o secvență de oprire este de obicei o bună indicație că am identificat regiunea codificatoare a unei gene.

Modul în care genele sunt organizate în genomurile eucariote (inclusiv genomul uman) face căutarea directă a ORF-urilor mai dificilă decât în genomurile procariote. În primul rând, multe gene eucariote conțin introni. Drept urmare, multe gene eucariote (posibil majoritatea) nu sunt organizate ca ORF-uri continue; în schimb, secvențele genetice sunt compuse din ORF-uri (exoni) intercalate cu introni. În al doilea rând, genele la oameni și la alte eucariote sunt adesea destul de îndepărtate una de cealaltă, crescând probabilitatea întâlnirii cu ORF-uri false în regiunile dintre diferite grupuri de gene.

Adnotarea secvenței prezentată în Figura 21.6(a) relevă mai mulți indicatori identificabili că secvența conține o genă care codifică proteine: include o secvență promotor , un codon de start și trei *exoni.* [Figura 21.6(b)]. Cele două regiuni neumbrite dintre exoni reprezintă introni care vor fi eliminați prin mecanismul de splicing după transcripție, când ARNm este procesat [Figura 21.6 (b, c)J]. Folosind această secvență ca interogare într- o căutare în bazele de date genomice, am vedea că este secvența unei singure gene, gena β-globinei umane .

Software-ul conceput pentru analiza distribuțiilor de frecvență în buclă deschisă (ORF) (ORF-uri) ale genomurilor eucariote este extrem de util. Astfel de programe sunt adesea folosite pentru a efectua predicții computerizate ale tuturor ORF-urilor (ORFeomul!) prezente într-un genom secvențiat , ca o modalitate de a estima numărul de gene potențiale care codifică proteine din acel genom. Pe lângă caracteristicile menționate mai sus, un astfel de software poate fi utilizat pentru a „traduce ” ORF-urile în posibile secvențe polipeptidice, ca o modalitate de a prezice polipeptida codificată de o genă. Figura 21.7 prezintă o secvență parțială a primului exon al genei tubulinei alfa - 3c umane *(TUBA3C).* Programele de predicție analizează potențialele ORF-uri în direcția 5' către 3' pe ambele catene ale unei secțiuni de ADN genomic pentru a prezice posibilele ORF-uri în fiecare direcție. Figura 21.7 prezintă rezultatele pentru

(a) *Homo sapiens TUBA3C* (1-300 perechi de baze)

1 ggttgaggtcaagtagtagcgttgggctgcggcagcggaggagctcacatgcgtgagtg

61 tate te ta tccacg tggggcaggcaggagtccagatcggcaatgcc tgc tgggaac **tgt** *a*

121 ctgcctggaacatggaattcagccgatggtcagatgccaagtgataaaccattggtgg

181 tgggacgactccttcaacgttctcagtgagactggagctggcaagcacgtgcccag

241 agcagtgttgtggacctggagcccactgtggtcgatgaagtgcgcacaggaacctatag (300)

(b) Polipeptide prezise

C Stop GQVVALGCGSGGAQHA Stop VYLYPRGAGRSPDRQCLLG TVLPGTWNSARWSDAK Stop Stop NHWWWGRLLQHVLQ Stop D W SWQARAQSSVCGPGAHCGR Stop SA H RNL Stop

Marco 2, 5' la 3'

V EVK Stop Stop R W A A A A E E LN Met R E C I S I H VG QAG VQ I GN A CW EL Y C L E H G IQ P DG Q Met PSD K T I G G *G* D D SF N T FF SE T G A GK H V PRAVFVDLEPTVVDEVRTGTY

Ameteli 3, la 3'

În acest caz , temperatura camerei (în funcție de temperatură) , ...

Minai. *iii*

L Stop VPVRTSSTTVGSRSTNTALGTCLPAPVSLKNVLKESSPPP Met V L SLG I Stop PSG Stop IPCSRQYSSQQALPIWTPACPTWIEIH SRMetISSSAAAAQRYYLTST

Mar£2JLIAi

Oprire RTC Oprire R SR P HHQWFYHLASDHRAEFHVPGSTVPSRHCRSGLLPAPRG Oprire R YT H AC Oprire APPLPQPNATT Oprire P Q

Marco 3, 3' la 5'

acest caz , este posibil să se utilizeze o metodă de preparare a conținutului pentru toate tipurile de aplicații .

FIGURA 21.7 Secvențe polipeptidice prezise, traduse din ORF-uri potențiale din *gena TUBA3C* umană . (a) Nucleotidele 1-300 ale primului exon al *genei TUBA3C umane.*
(b) Un program de traducere prezice șase secvențe polipeptidice posibile din acest exon. Care dintre secvențele prezise este corectă? *Notă:* Metionina este evidențiată folosind codul de aminoacizi din trei litere (Met).

cele șase ORF-uri posibile din secvența de interes. Aminoacizii sunt afișați folosind codul cu o singură literă corespunzător fiecărui reziduu. Observați rezultatele foarte diferite obținute pentru fiecare dintre cele șase cadre. De exemplu, ORF 1 5' - 3' conține mai mulți codoni stop împrăștiați printre aminoacizi, dar niciun reziduu de metionină care ar fi o dovadă a unui codon de start . Alte ORF-uri ar conține prea multe metionine pentru a produce un polipeptid funcțional. Pentru acest exon TUBA3C , *ORF* 2 5' - 3' este corect.

Programele de predicție pot verifica, de asemenea, tendința de codon, care este utilizarea excesivă a unuia sau a doi codoni specifici pentru a codifica un aminoacid care ar putea fi codificat de mai mulți codoni diferiți. De exemplu, alanina poate fi codificată de GCA, GCT, GCC și GCG. Dacă codonii ar fi utilizați aleatoriu , fiecare ar fi utilizat în 25% din cazuri. Cu toate acestea, în genomul uman, GCC este utilizat în 41 % din cazuri, iar GCG doar în 1 % . Tendința de codon este prezentă în exoni, dar nu ar trebui să fie prezentă în introni sau în spațiile intergenice .

ACUM REZOLVĂ ASTA |

21.2 Procesul de adnotare a unui genom secvențiat este o sarcină continuă. Când a fost publicată prima secvență adnotată a genomului Drosophila , au fost prezise 13.601 gene care codifică proteine în regiunea eucromatică a genomului. Următoarele date sunt selectate din următoarele două versiuni adnotate publicate (date modificate după cele publicate în Misra și colab., 2002. *genomebiology3(12)@genomebiology.com/2002/3/12/RESEARCH/0083).*

(a) Presupunând o distribuție uniformă în Versiunea 3, aproximativ câte perechi de baze ADN există între fiecare pereche de gene care codifică proteine la *Drosophila?*
(b) În medie, aproximativ câți exoni există per genă în versiunea 3?
(c) Aproximativ câți introni există per genă?
(d) Care pare a fi cea mai semnificativă diferență dintre versiunea 2 și versiunea 3?

Criterii	Versiunea 2	Versiunea 3
Lungimea totală a eucromatinei	116,2 MB	116,8 MB
Numărul total de gene care codifică proteine	13.474	13.379
exoni care codifică proteine	50.667	54.934
Introni	48.381	48.257
Genele cu transcrieri alternative	689	2.729

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ridică o serie de întrebări specifice despre două versiuni ale genomului Drosophila adnotat. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a potențialelor relații dintre genele care codifică proteine , numărul de exoni care codifică proteine și mecanismele alternative de splicing .*

21.3

Genomica funcțională urmărește să identifice funcțiile potențiale ale genelor și ale altor elemente ale unui genom

Citirea unei secvențe genomice este un remediu sigur pentru - insomnie. Partea interesantă nu este secvența de nucleotide în sine , ci informațiile pe care le conține. După adnotarea unui genom și identificarea regiunilor de frecvență deschisă (ORF), următorul pas în procesul analitic este atribuirea unor funcții presupuse tuturor genelor posibile dintr -o secvență. După cum sugerează și termenul, genomica funcțională este studiul funcțiilor genelor , pe baza ARN-urilor rezultate sau a posibilelor proteine pe care le

codifică, precum și a funcțiilor altor componente ale genomului, cum ar fi elementele de reglare a genelor. Genomica funcțională poate cuprinde tehnici experimentale utilizate pentru a confirma sau infirma predicțiile computerizate despre funcțiile genomice (cum ar fi numărul de gene care codifică proteine) și ia în considerare, de asemenea, modul în care sunt exprimate genele și mecanismele care reglează expresia genelor.

Predicția funcțiilor genelor și proteinelor prin analiza secvențelor

Genele conținute în unele secvențe genomice nou identificate pot avea deja funcții atribuite, datorită utilizării metodelor clasice, cum ar fi mutageneza și maparea linkage-urilor, dar multor alte gene secvențiate nu li s-a atribuit încă o funcție. O tehnică de atribuire a funcțiilor genelor implică utilizarea căutărilor de similaritate a secvențelor, așa cum este descris în secțiunea anterioară. Programe precum BLAST sunt utilizate pentru a căuta în bazele de date pentru a găsi alinieri între genomul nou secvențiat și genele care au fost deja identificate, fie la aceeași specie, fie la o specie diferită. În Figura 21.4, am prezentat această metodă de prezicere a funcției genelor , arătând cum similaritatea secvenței cu o genă de șoarece a fost utilizată pentru a identifica o genă contig de șobolan drept gena receptorului de insulină. Încercarea de a deduce funcția genelor din căutările de similaritate este o tehnică bazată pe o idee relativ simplă . Dacă o secvență genomică prezintă o similaritate semnificativă statistic cu secvența ...

care au fost atribuite genelor genomului micii angiosperme *Arabidopsis thaliana,* pe baza căutărilor de similarități. Pentru geneticieni, *Arabidopsis* este musca de fructe a lumii vegetale. *Arabidopsis* este mică, are un timp de generație scurt și un genom relativ mic, distribuit pe cinci cromozomi. Dar și mai important, regnul vegetal a evoluat independent de regnul animal, iar analiza angiospermelor poate oferi informații despre modul în care un gen cuya función se conoce, entonces es probable que esa secuencia del genoma codifique una proteina con una función similar o relacionada.

Por ejemplo, la Figura 21.8 indica categorías funcionales

adaptările evolutive sau coevolutive le-au modelat genomurile. Cel puțin jumătate dintre

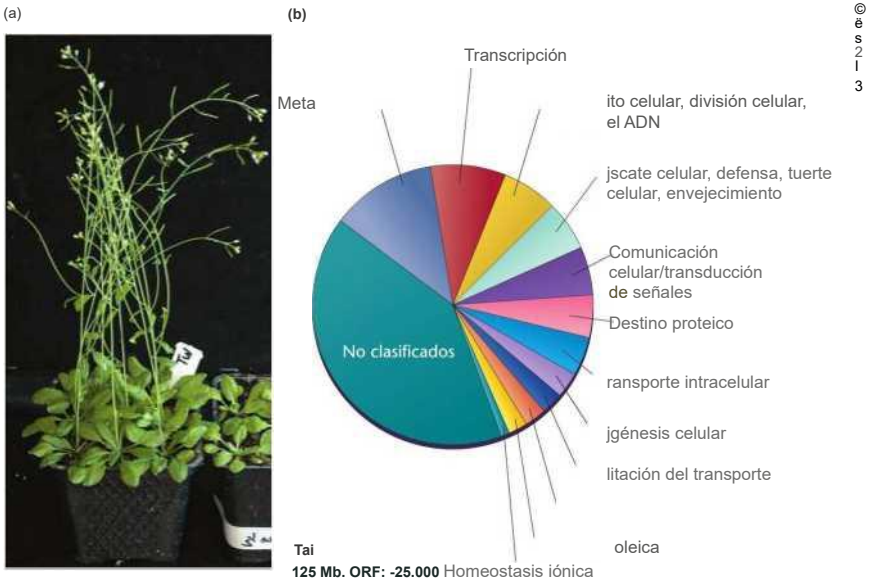


FIGURA 21.8 *Arabidopsis thaliana.* (a) Una pequeña planta utilizada como modelo genético para el estudio de la organización genómica y el desarrollo de las angiospermas. (b) Asignación de los genes de *Arabidopsis* a una serie de categorías funcionales, basándose en búsquedas de homólogos.

genele din genomul *Arabidopsis* sunt identice sau strâns înrudite cu genele găsite la bacterii și oameni, dar conține și gene care codifică zeci de familii de proteine ce pot fi unice plantelor.

Un alt avantaj major al căutărilor de similaritate este că acestea permit adesea identificarea genelor omoloage - gene care sunt înrudite evolutiv. După secvențierea genomului uman, multe cadre de referință deschise de frecvență (ORF) au fost identificate ca gene care codifică proteine pe baza alinierii lor cu gene înrudite de la alte specii a căror funcție era deja cunoscută. Ca exemplu, Figura 21.9 compară porțiuni ale genei leptinei umane *(LEP)* cu omologul său de șoarece *(ob/Lep).* Secvențele acestor două gene se potrivesc cu peste 85%. Gena leptinei a fost descoperită pentru prima dată la șoarece. Corespondența dintre secvența de ADN care conține *LEP* la om și secvența omoloagă de șoarece confirmă identitatea și funcția care codifică leptina a acestei gene în genomul uman.

Ca o notă interesantă, gena leptinei (numită și *ob,* pentru obezitate, la șoareci) este exprimată la niveluri ridicate în celulele adipoase (adipocite). Această genă produce hormonul proteic leptină, care acționează asupra celulelor creierului pentru a suprima pofta de mâncare . Șoarecii modificați genetic, cărora le lipsește o genă *ob funcțională* , dezvoltă o creștere extraordinară în greutate. Un fenotip similar a fost observat la un număr mic de persoane purtătoare de mutații specifice în *LEP. Deși* este important de subliniat faptul că controlul greutății nu este reglat de o singură genă, descoperirea leptinei a oferit perspective semnificative asupra mecanismelor lipidelor și a tulburărilor de greutate la om. Studiile viitoare asupra leptinei vor avea un...

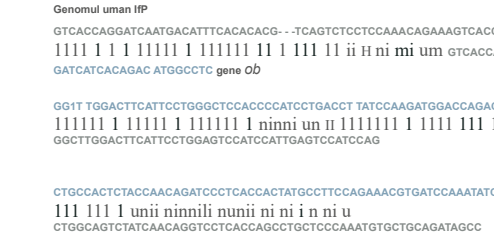


FIGURA 21.9 Comparație între gena LEP umană și gena *ob/Lep* de șoarece . Sunt prezentate secvențe parțiale ale acestor omologi cu gena LEP . omul în partea de sus și secvența genei *ob/Lep* de șoarece dedesubt . Observați, analizând numărul de nucleotide identice, indicate prin linii verticale, că secvențele de nucleotide ale acestor două gene sunt foarte similare. Lacunele sunt indicate prin linii orizontale. de mare importanță pentru o mai bună înțelegere a geneticii tulburărilor de greutate.

se consideră că genele omoloage din diferite specii descind dintr-o genă prezentă într -un strămoș comun , genele se numesc ortologi. În secțiunea 21.6, vom analiza familia de gene ale globinei . Genele α-globinei la șoareci și oameni sunt ortologi care au evoluat dintr -un strămoș comun . Genele omoloage din cadrul aceleiași specii se numesc paralogi . Subunitățile α- globinei și β -globinei la oameni sunt paralogi rezultați dintr -un eveniment de duplicare genică . Paralogii au de obicei funcții similare sau identice .

Predicția funcției din analiza structurală a motivelor și domeniilor proteice

Când o secvență genetică este utilizată pentru a prezice secvența polipeptidică , polipeptida poate fi analizată pentru motive și domenii structurale specifice . Identificarea domeniilor proteice , cum ar fi canalele ionice , regiunile transmembranare , regiunile de legare a ADN-ului , semnalele de export și secreție și alte caracteristici structurale ale unei polipeptide codificate de o -secvență de ADN , poate fi apoi utilizată pentru a prezice funcția proteinei. Reamintim din Capitolul 17, de exemplu, că structurile multor proteine care leagă ADN-ul prezintă modele sau motive caracteristice , cum ar fi helix -turn-helix, fermoarul de leucină sau motivul degetului de zinc . Software -ul bioinformatic poate fi adesea utilizat pentru a căuta aceste motive, iar identificarea lor într-o secvență este o strategie comună pentru deducerea funcțiilor potențiale ale unei proteine .

Cercetătorii utilizează tehnici genomice, cum ar fi imunoprecipitarea cromatinei, pentru a investiga aspecte ale funcției și reglării genomice.

În acest capitol și în Capitolul 22, vom analiza diferite tehnici genomice utilizate de cercetători și care sunt foarte utile pentru studiile de genomică funcțională . Un exemplu este o tehnică numită imunoprecipitare a cromatinei (ChIP) , iar o alta este o tehnică -similară care combină ChIP cu cipuri ADN și se numește ChIP-on-chip. Aceste tehnici sunt concepute pentru a cartografia interacțiunile proteină - ADN și sunt foarte utile pentru identificarea genelor care sunt reglate de factorii de transcripție care se leagă de ADN .

Pentru a aplica aceste tehnici, cercetătorii tratează țesuturi sau celule izolate, cum ar fi drojdia, cu formaldehidă (Figura 21.10). Formaldehida va face ca orice proteină strâns legată de ADN să formeze legături încrucișate cu

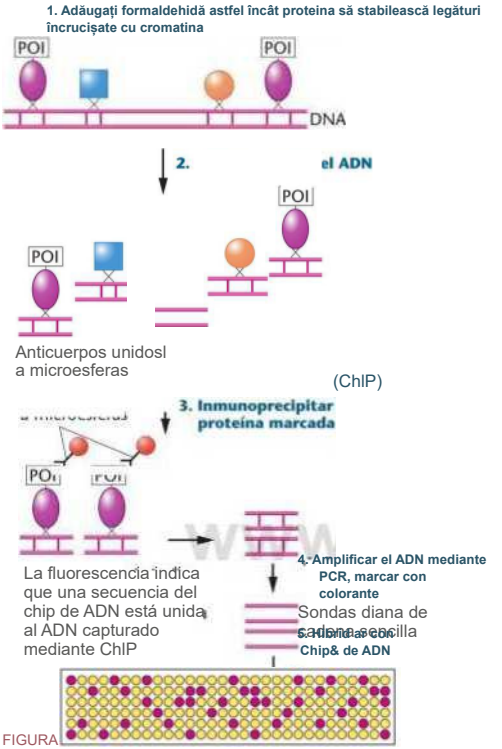


FIGURA 21.10

C 2Û01 Macmillan Publishers Ltd.

Analiza genomului pentru localizarea situsurilor de legare a factorilor de transcripție poate fi efectuată utilizând tehnica ChiP -cnvchip. În această metodă, formaldehida este adăugată la țesuturile sau celulele cultivate , astfel încât proteinele legate de ADN în acel moment să se încrucișeze cu ADN-ul. ADN-ul este apoi extras din celule și tăiat în fragmente mici. Un anticorp sau anticorpi care recunosc proteinele specifice de legare a ADN-ului de interes, cum ar fi un factor de transcripție, sunt adăugați în amestec, iar acești anticorpi se leagă de proteine . Anticorpul, împreună cu fragmentul său proteină-ADN, este apoi extras din amestec (imunoprecipitat) . Fragmentele de ADN imunoprecipitate sunt purificate și adesea amplificate prin PCR, după care sunt marcate cu un colorant fluorescent și hibridizate la un cip ADN . Un semnal pozitiv de hibridizare indică o secvență de ADN care a fost legată de proteina de interes (indicată de marcajul POI din figură).

Cercetătorii extrag apoi ADN-ul din celule și îl tăiază în fragmente mici. Pentru a izola acele fragmente de ADN legate de o proteină specifică, aceștia adaugă un anticorp care recunoaște (se leagă de) acea proteină. Acești anticorpi sunt de obicei atașați la o microsferă sau un fragment de rășină care permite precipitarea anticorpului (prin imunoprecipitare) din amestec, împreună cu proteina de care este legat și fragmentele de ADN care au format legături încrucișate cu proteina. Imunoprecipitarea se efectuează de obicei prin centrifugarea complexelor anticorp/proteină/ADN. Deoarece anticorpul este atașat la o microsferă, masa acesteia este utilizată pentru a centrifuga complexele anticorp/proteină/ADN pe fundul tubului de centrifugare. Cercetătorii pot apoi purifica fragmentele de ADN imunoprecipitate prin îndepărtarea lor din complexul anticorp/proteină, apoi amplifica aceste fragmente de ADN prin PCR și marca fragmentele amplificate cu un marker fluorescent.

Fragmentele de ADN marcate sunt hibridizate la un cip ADN (descris în Secțiunea 21.9) care conține oligonucleotide sintetice sau molecule de ADN clonate reprezentând întregul genom al organismului. Orice punct de pe cipul ADN care hibridizează la ADN-ul marcat va reprezenta o secvență de ADN care a fost legată de proteină. Deoarece fiecare punct de pe cipul ADN este cunoscut, se poate determina identitatea fiecărui semnal pozitiv. ADN-ul izolat prin ChIP poate fi, de asemenea, secvențiat pentru a identifica secvențele legate de proteinele care leagă ADN-ul. Într-o aplicație a acestei metode de analiză a întregului genom, au fost identificate peste 20 de ținte necunoscute anterior ale unei proteine activatoare a transcripției care funcționează la interfața G1/S a ciclului celular.

21.4

Proiectul Genomului Uman a dezvăluit multe aspecte importante ale organizării genomului la specia umană

Acum , că avem o idee generală despre strategiile utilizate pentru a analiza un genom, să ne uităm la cel mai mare proiect genomic finalizat până în prezent. Proiectul Genomului Uman (HGP) a fost un efort internațional coordonat pentru a determina secvența genomului uman și a identifica toate genele pe care le conține. Acesta a produs o cantitate vastă de informații, multe dintre acestea

fiind încă analizate și interpretate. Ceea ce este clar până acum, analizând toate tipurile diferite de genomuri secvențiate, este că oamenii și toate celelalte specii au un set comun de gene esențiale pentru funcția și reproducerea celulelor , confirmând că toate - organismele vii au provenit dintr-un strămoș comun.

Originile proiectului

Proiectul Genomului Uman, dezvoltat cu fonduri publice , a început în 1990 sub conducerea lui James Watson, codescoperitorul structurii duble helix a ADN-ului. Acest proiect public a fost condus ulterior de Dr. Francis Collins, care anterior condusese o echipă de cercetare implicată în identificarea genei *CFTR* drept cauză a fibrozei chistice. În Statele Unite , proiectul condus de Collins a fost coordonat de Departamentul de Energie și de Centrul Național pentru Cercetarea Genomului Uman, o divizie a Institutului Național de Sănătate. Acesta a stabilit un plan pe 15 ani cu un buget propus de 3 miliarde de dolari pentru a identifica toate genele umane, despre care se credea inițial că sunt între 80.000 și 100.000, pentru a le secvența și cartografia pe toate și pentru a cartografia cele aproximativ 3 miliarde de perechi de baze despre care se credea că alcătuiesc cei 24 de cromozomi (22 de autozomi plus X și Y) din specia umană . Alte obiective principale ale HGP au fost următoarele:

- Stabilirea unor categorii funcționale pentru toate genele umane.
- Analizarea variațiilor genetice la oameni , inclusiv identificarea polimorfismelor cu un singur nucleotid (SNP).
- Pentru a cartografia și secvența genomurilor mai multor - organisme model utilizate în genetica experimentală, inclusiv *E. coli, S. cerevisiae,* C. *elegans, D. melanogaster* și *M. musculus* (șoarece).
- Dezvoltarea de noi tehnologii de secvențiere, cum ar fi secvențiatoarele computerizate de mare randament , pentru a facilita analiza genomică .
- Diseminarea informațiilor genomice atât în rândul oamenilor de știință, cât și al publicului larg.

În cele din urmă, pentru a aborda impactul pe care informațiile genetice l-ar avea asupra societății, HGP a înființat programul ELSI (Implicații *etice, legale și sociale)* . să ia în considerare problemele etice, juridice și sociale care decurg din PGM și să se asigure că informațiile genetice cu caracter personal vor fi conservate și nu vor fi utilizate în mod discriminatoriu.

Pe măsură ce PGH a evoluat într- un proiect internațional , oameni de știință din 18 țări s-au implicat în dezvoltarea *sa* . O mare parte a muncii a fost realizată de Consorțiul *Internațional* pentru *Secvențierea Genomului* Uman . care a reunit aproape 3.000 de oameni de știință care lucrează în 20 de centre din șase țări (China, Franța, Germania , Marea Britanie, Japonia și Statele Unite).

În 1999, a fost anunțat un Proiect al Genomului Uman, finanțat privat, condus de J. Craig Venter la Celera Genomics (o companie cu un nume destul de potrivit, derivat din cuvântul latin pentru „viteză"). Scopul Celera era de a utiliza secvențierea fragmentelor aleatorii din întregul genom și secvențiatoare de ADN automatizate , de mare randament , pentru a secvența genomul uman mai rapid decât HGP . Proiectul public propusese utilizarea secvențierii clonă cu clonă . Reamintim că Venter și colegii săi demonstraseră potențialul secvențierii fragmentelor aleatorii în 1995 , când au finalizat genomul *H. influenzae* . Anunțul Celera a stârnit o concurență intensă între cele două echipe, deoarece ambele aspirau să fie primele care secvenționează genomul uman . Acest tip de cursă a sfârșit prin a cauza încheierea proiectului HGP mai devreme decât era planificat și la un cost mai mic decât cel bugetat , după ce oamenii de știință care participau la proiectul public au început , de asemenea, să utilizeze secvențiatoare de mare randament și strategii de secvențiere a întregului genom .

Principalele caracteristici ale genomului uman

În iunie 2000, directorii proiectelor genomice publice și private s-au întâlnit la Casa Albă cu președintele Clinton și au anunțat împreună finalizarea unei versiuni preliminare a secvenței genomului uman. În februarie 2001 , fiecare a publicat o analiză care acoperă aproximativ 96 % din regiunea eucromatică a genomului . Proiectul public a secvențiat regiunile eucromatice ale genomului de 12 ori și a stabilit un standard de control al calității de o rată de eroare de 0,01 % în secvență. Deși această rată de eroare poate părea foarte scăzută, ea permite totuși aproximativ 600.000 de erori în secvența genomului uman. Celera a secvențiat anumite zone ale genomului de peste 35 de ori în timpul procesului de compilare .

Munca rămasă, de completare a secvenței, umplerea golurilor , s-a concentrat pe centromeri , telomeri și secvențe repetitive , - corectarea segmentelor nealiniate și resecvențierea părților genomului pentru a asigura acuratețea. În 2003, sarcinile de secvențiere a genomului și de corectare a erorilor

au fost considerate suficiente pentru a îndeplini criteriile de terminare stabilite de proiectul internațional - ca secvența să conțină mai puțin de o eroare la 10.000 de nucleotide și să acopere 95% din părțile genomului care conțin gene. Cu toate acestea, chiar și în momentul în care sarcina a fost considerată „terminată", existau încă aproximativ 350 de lacune în secvență care erau abordate .

Și, bineînțeles, proiectul HGP nu a secvențiat genomul fiecărei persoane de pe Pământ. Genomurile asamblate au fost compuse în principal din genomuri haploide extrase de la diferiți indivizi pentru a oferi un *genom de referință* reprezentativ pentru principalele elemente comune ale unui genom uman, răspândit pe scară largă în rândul diverselor populații ale Pământului. Tabelul 21.1 oferă exemple ale unor caracteristici ale genomului uman. După cum se poate vedea din tabel, mai multe observații neașteptate ne-au permis să ne îmbunătățim considerabil înțelegerea asupra genomului. Genomul nu este static! Variațiile genomice , inclusiv abundența secvențelor repetitive împrăștiate în tot genomul, confirmă faptul că genomul este într-adevăr dinamic, dezvăluind multe exemple evolutive de secvențe care s-au schimbat în structură și poziție . În multe privințe, proiectul HGP a evidențiat pur și simplu cât de puțin știm de fapt despre genomul nostru.

Două dintre cele mai mari surprize ale proiectului HGP au fost faptul că mai puțin de 2% din genom codifică proteine și că există doar aproximativ 20.000 de gene care codifică proteine. Reamintim că numărul de gene a fost estimat inițial la aproximativ 100.000, bazat parțial pe predicția că celulele umane produc aproximativ 100.000 de proteine. Cel puțin jumătate dintre gene prezintă similarități de secvență cu genele comune multor alte organisme și, așa cum vom vedea în Secțiunea 21.7, majoritatea genelor umane au similarități de secvență cu genele speciilor strâns înrudite, cum ar fi cimpanzeii. Încă nu suntem siguri cu privire la numărul exact de gene umane. Un motiv este că nu este clar dacă multe dintre presupusele gene produc proteine funcționale. Oamenii de știință din domeniul genomului continuă să adnoteze genomul și, așa cum am menționat anterior, studiile de genomică funcțională au un rol important de jucat în determinarea exactității predicțiilor computerizate despre numărul de gene care codifică și nu codifică proteine.

Numărul de gene este mult mai mic decât numărul prezis de - proteine, parțial pentru că multe gene codifică multe proteine datorită mecanismelor de clivaj .

TABLA 21.2 Principalele caracteristici ale genomului uman

- Genomul uman conține 3,1 miliarde de nucleotide , dar secvențele care codifică proteinele reprezintă doar aproximativ 2 % din genom.
- genomului este similară în proporție de 99,9 % între indivizii de toate naționalitățile . Polimorfismele cu un singur nucleotid (SNP) și variațiile numărului de copii (CNV) sunt responsabile pentru diversitatea genomică între diferite persoane .
- Genomul este dinamic. Cel puțin 50 % din genom este derivat din elemente transpozabile, cum ar fi secvențele UNE și *Alu , precum și alte* secvențe repetitive de ADN .
- Genomul uman conține aproximativ 20.000 de gene care codifică proteine, mult mai puține decât numărul prezis de 80.000-100.000 de gene.
- Dimensiunea medie a unei gene umane este de aproximativ 25 kb, incluzând regiunile reglatoare , intronii și exonii genei . În medie, ARNm-urile produse de genele umane au o lungime de aproximativ 3000 de nucleotide .
- Multe gene umane produc mai mult de o proteină datorită mecanismelor alternative de splicing , permițând astfel celulelor umane să producă un număr mult mai mare de proteine (poate chiar și 200.000) din doar 20.000 de gene.
- Peste 50 % dintre genele umane prezintă un grad ridicat de similaritate a secvenței cu genele altor organisme; cu toate acestea, peste 40 % dintre genele identificate nu au o funcție moleculară cunoscută .
- Genele nu sunt distribuite uniform între cei 24 de cromozomi umani. Grupurile bogate în gene sunt separate de „deșerturi" sărace în gene, care constituie aproximativ 20 % din genom. Aceste deșerturi sunt corelate cu benzile G vizibile pe cromozomii colorați. Cromozomul 19 are cea mai mare densitate genetică , în timp ce cele mai mici densități genetice se găsesc pe cromozomul 13 și cromozomul Y.
- Cromozomul 1 conține cel mai mare număr de gene, în timp ce cromozomul Y conține cel mai mic număr .
- Genele umane sunt mai mari și conțin introni mai mulți și mai mari decât genele găsite în genomurile nevertebratelor , cum ar fi *Drosophila*. Cea mai mare genă umană cunoscută codifică distroful , o proteină musculară . Această genă , asociată în Forma sa mutantă asociată cu distrofia musculară are o lungime de 2,5 Mb (Capitolul 14), mult mai mare decât mulți cromozomi bacterieni . Cea mai mare parte a acestei gene este compusă din introni .
- Numărul de introni din genele umane variază de la 0 (în genele histonei) până la 234 (în gena titinei , care codifică o proteină musculară).

și splicing alternativ. Reamintim din Capitolul 13 că modelele de splicing alternativ pot genera mai multe molecule de ARNm și , prin urmare , mai multe proteine , dintr -o singură genă , datorită diferitelor combinații de splicing ale intronilor și exonilor. Estimările inițiale sugerează că peste 50 % din genele umane sunt supuse unui splicing alternativ , producând mai multe transcrieri și mai multe proteine. Studii recente sugerează că 94-95% din

pre -ARNm-urile umane conțin mai mulți exoni care sunt procesați pentru a genera mai multe transcrieri și, potențial , mai multe produse proteice distincte. Evident , mecanismele de splicing alternativ produc o diversitate incredibilă de proteine , mult dincolo de predicțiile simpliste bazate pe numărul de gene din genomul uman .

Genelor umane li s-au atribuit categorii funcționale , în principal pe baza (1) funcțiilor determinate anterior (de exemplu, din clonarea genelor umane folosind ADN recombinant și mutații cunoscute implicate în tulburări umane), (2) comparației cu gene cunoscute și secvențelor proteice prezise la alte specii și (3) predicțiilor bazate pe adnotarea și analiza motivelor proteice și a domeniilor funcționale (Figura 21.11). Deși categoriile funcționale și atribuirile continuă să fie revizuite, funcțiile a peste 40% din genele umane rămân necunoscute . Determinarea funcțiilor genelor umane , descifrarea complexității reglării expresiei genelor și a interacțiunilor genelor și descoperirea relațiilor dintre genele umane și fenotipuri se numără printre principalele provocări cu care se confruntă oamenii de știință specializați în cercetarea genomului.

Proiectul HGP ne -a arătat, de asemenea , că secvența genomică este identică în proporție de aproximativ 99,9% la toate ființele umane , indiferent de originea lor etnică sau rasială. Așa cum am explicat în alte capitole, majoritatea diferențelor genetice dintre oameni rezultă din polimorfisme cu un singur nucleotid (SNP) și variații ale numărului de copii (CNV). Reamintim că SNP-urile sunt modificări ale unei singure baze în genom și că variațiile multor SNP-uri sunt asociate cu boli. De exemplu, polimorfismele SNP - sunt responsabile de anemia falciformă și fibroza chistică . În Capitolul 22, vom examina modul în care pot fi detectate SNP-urile și cum pot fi utilizate pentru diagnosticarea și tratamentul bolilor.

După finalizarea secvenței preliminare a genomului uman, inițial s -a părut că cea mai mare parte a variației genomice între indivizi (acea diferență de 0,1%) se datora polimorfismelor SNP . Însă , deși SNP-urile sunt un factor important care contribuie la variația genomică , diferențele structurale pe care le- am discutat în Capitolul 12 - cum ar fi delețiile, duplicările, inversiunile și variațiile CNV care pot cuprinde milioane de perechi de baze ADN - joacă un rol semnificativ .

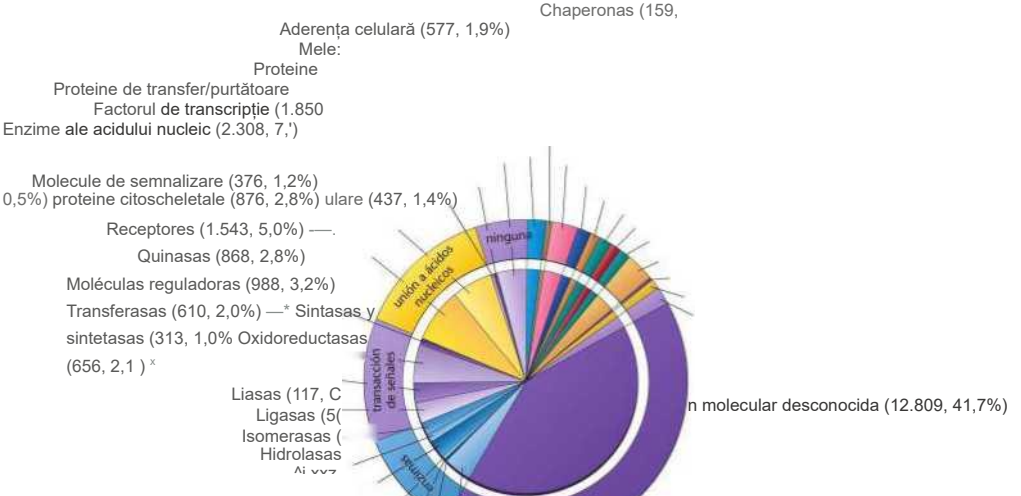


FIGURA 21.11 Una lista preliminar de las categorías funcionales a las que se han asignado los genes del genoma humano, basándose en la similitud con proteínas de función conocida. Entre los genes más comunes están los implicados en el metabolismo de los ácidos nucleicos (7,5 por ciento de todos los genes identificados), los factores de transcripción (6,0 por ciento), los receptores (5 por ciento), las hidrolasas (4 por ciento), las proteínas quinasas (2,8 por ciento) y las proteínas estructurales citoesqueléticas (2,8 por ciento). Un total de 12.809 de las proteínas predichas (41 por ciento) tienen funciones desconocidas, lo que indica el trabajo que todavía queda por hacer para descifrar completamente nuestro genoma.

Duline (264, 0,9%) lice (406, 1,3%) isuri (376, 1,2%) proteine structurale musculare (296, 1,0%) : oncogene (902, 2,9%) proteine care leagă calciul (34, 0,1%) Transportori intracelulari (350, 1,1%) Transportorii (533, 1,7%)

joacă roluri mult mai importante în variația genomică decât se credea anterior. Așa cum am explicat în capitolele 8 și 12, rețineți că variațiile CNV-urilor sunt duplicări sau deleții ale unor secțiuni relativ mari de ADN, de ordinul a câteva sute sau câteva mii de perechi de baze. Multe dintre CNV-urile care variază cel mai mult între genomuri par să aibă o lungime de cel puțin 1 kilobază .

Deși majoritatea ADN-ului uman este moștenit în două copii per celulă, câte unul de la fiecare părinte, CNV-urile sunt segmente de ADN care sunt duplicate sau șterse, ceea ce duce la variații ale numărului de copii ale unui segment de ADN moștenit de un individ. În unele cazuri, CNV-urile sunt deleții la scară largă care elimină gene întregi, în timp ce alte deleții afectează funcția genelor din cauza mutațiilor de schimbare a cadrului de citire . Secvențele CNV duplicate pot provoca supraexprimarea unei gene specifice , deși multe CNV-uri șterse și duplicate nu prezintă fenotipuri clar identificabile .

Estimările actuale ale numărului de variații ale CNV-urilor dintr-un genom individual variază de la aproximativ 12 CNV-uri până la poate 4-5 duzini per persoană. Unele studii estimează că pot exista până la 1.500 de CNV-uri mai mari de 1 kb în genomul uman . Alte studii afirmă că există peste 1,5 milioane de deleții cu mai puțin de 100 de perechi de baze care contribuie la variația genomică între indivizi.

Astăzi, bazele de date și alte site-uri web afișează hărți ale tuturor cromozomilor umani. Vom vizita câteva dintre aceste baze de date în exercițiile din secțiunea Explorarea *genomicii* . Figura 21.12(a) prezintă o hartă genetică parțială a cromozomului 12, obținută dintr -o bază de date NCBI numită Map Viewer. Este posibil să fi folosit deja Map Viewer pentru exercițiile din secțiunea *Explorarea* genomicii . Din capitolele 5 și 12. Această imagine prezintă o ideogramă , sau o hartă citogenetică, a cromozomului 12. În dreapta ideogramei se află o coloană care prezintă contigii (aranjați vertical) care au fost aliniați pentru a secvența acest cromozom. Coloana Hs UniG prezintă o histogramă care reprezintă densitatea genelor pe cromozomul 12. Rețineți că există relativ puține gene în apropierea centromerului . Sunt furnizate simbolurile, loci-urile și denumirile (descrierile) unui număr de gene selectate . În această figură sunt prezentate doar 20 de gene . Accesând aceste hărți online, puteți mări fiecare regiune a cromozomului, permițându -vă să cartografiați toate genele situate într -o anumită zonă.

După cum puteți vedea, majoritatea genelor enumerate aici au descrieri atribuite care se bazează pe funcțiile produselor lor , unele dintre acestea fiind proteine transmembranare, enzime precum kinazele, unii receptori, inclusiv câțiva legați de olfacție etc. Alte gene sunt descrise în termeni de produse ipotetice; se presupune că sunt gene bazate pe prezența cadrelor ORF, dar funcția lor rămâne necunoscută [Figura 21.12(a)].

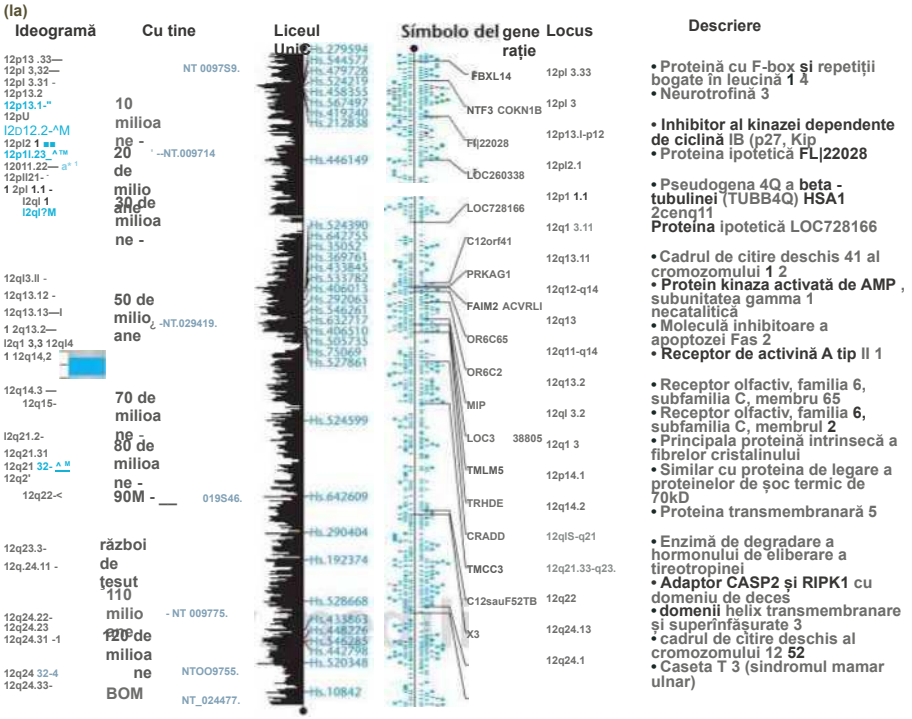
Probabil cea mai valoroasă contribuție a proiectului HGP este identificarea genelor legate de boli și dezvoltare , ceea ce duce la noi strategii de tratament . Au fost elaborate hărți complete ale genelor implicate în bolile umane. Harta genelor legate de boli ale cromozomului 21 este prezentată în Figura 21.1 2(b), care indică genele implicate în scleroza laterală amiotrofică (SLA), boala Alzheimer, cataractă, surditate și mai multe tipuri diferite de cancer. În Capitolul 22, vom discuta implicațiile proiectului HPG pentru identificarea genelor implicate în bolile umane moștenite, precum și aplicațiile sale în diagnosticarea și screening-ul bolilor și terapia genică.

21,5

Revoluția „omică” a inaugurat o nouă eră în cercetarea biologică

Proiectul Genomului Uman și dezvoltarea tehnicilor genomice au fost în mare măsură responsabile pentru începutul unei noi ere a cercetării biologice - era „omicii”. Se pare că în fiecare an, tot mai multe domenii ale cercetării biologice sunt descrise ca având o relație cu „omica”. Câteva exemple de „omică” sunt:

- Proteomica, analiza tuturor proteinelor dintr-o celulă sau țesut.
- Metabolomica, analiza proteinelor și a căilor enzimatice implicate în metabolismul celular.
- Glicomică, analiza carbohidraților dintr-o celulă sau țesut.
- Toxicogenomica, analiza efectelor substanțelor chimice toxice asupra genelor, inclusiv mutațiile create de toxine și modificările pe care toxinele le provoacă în expresia genelor.
- Metagenomică, analiza genomurilor organismelor dintr-un anumit mediu pe baza probelor prelevate din acesta.
- Farmacogenomica, dezvoltarea medicinei personalizate - bazată pe profilul genetic al unei persoane, în raport cu o anumită tulburare.
- Transcriptomica, analiza tuturor genelor exprimate într-o celulă sau țesut.



(b)

Cromozomul 21
50 de milioane de baze
adeziune celulară a sindromului Down

Receptor de adenovirus şi coxsackievirus
Angiopatie amiloidă cerebrală , boală Alzheimer de tip olandez , legată de APP
Schizofrenie, sindrom Usher cronic, autosomal recesiv

Homocistinurie, Cataractă (congenitală, autosomal dominantă), Surditate (autosomal recesivă), Rezistenţă la mixovirusuri (gripă), Leucemie mieloidă acută

Sensibilitate la oligomicină Sindromul Jervell şi Lange-Nielsen Sindromul QT lung Molecula de

Sindromul mieloproliferativ tranzitoriu
Leucemia tranzitorie a sindromului Down

Deficiență de enterokinază
multiplă de carboxilază
Invazia și metastaza limfomului cu celule T

Infecție micobacteriană atipică
Sindromul Down (regiunea critică)
Sindromul poliglandular autoimun, tip 1

Miopatia Bethlem
Epilepsie mioclonică progresivă
Holoprozencefalie alobară
Sindromul Knobloch
Anemia hemolitică
Cancerul de sân
Tulburare plachetară asociată cu malignitate mieloidă

FIGURA 21.12 (a) Hartă genetică a cromozomului 12 extrasă din baza de date NCBI Map Viewer . (b) Hartă parțială a genelor cromozomului 21 uman legate de boli. Hărți ca aceasta arată gene despre care se crede că sunt implicate în bolile genetice umane.

În altă parte a acestui capitol, vom analiza câteva dintre aceste discipline genomice.

Ca dovadă a impactului genomicii , a apărut și un nou domeniu al științei nutriționale , numit genomică nutrițională sau nutrigenomică. Nutrigenomica se concentrează pe înțelegerea interacțiunilor dintre dietă și gene. Cu toții am avut controale medicale de rutină în care ni s-au măsurat tensiunea arterială, glicemia și ritmul cardiac. Pe baza acestor teste, un medic ne-ar putea recomanda să ne modificăm dieta și să facem mai multă mișcare pentru a pierde în greutate sau să reducem aportul de sodiu pentru a ajuta la scăderea tensiunii arteriale. Astăzi, mai multe companii susțin că oferă teste nutrigenomice care analizează genomurile noastre pentru gene despre care se crede că sunt asociate cu diferite tulburări de sănătate sau cu aspecte specifice ale metabolismului nutrienților. Aceste companii furnizează apoi un - raport nutrițional personalizat, recomandând schimbări în dietă pentru a ne îmbunătăți sănătatea și a preveni bolile, pe baza genelor noastre. Rămâne de văzut dacă această tehnică, așa cum este practicată în prezent, are validitate științifică în ceea ce privește valoarea nutrițională.

Genomica din epoca de piatră

Un alt exemplu al modului în care genomica a pătruns în anumite domenii ale analizei ADN-ului este activitatea laboratoarelor din întreaga lume care analizează ADN-ul „antic". Aceste studii, cunoscute sub numele de genomică din epoca de piatră , generează date fascinante din cantități infime de ADN antic obținut din oase și alte țesuturi, cum ar fi părul, care au o vechime de la zeci de mii până la 100.000 de ani și care sunt adesea extrase din probe de specii dispărute . Printre cele mai izbitoare exemple de genomică din epoca de piatră se numără analizele ADN ale unei mumii egiptene , bizoni , mușchi, ornitorinci , mamuți, urși polari și de peșteră din Pleistocen și neanderthalieni vechi de 2.400 de ani .

În 2005, cercetătorii de la Universitatea McMaster din Canada și de la Universitatea de Stat din Pennsylvania au publicat aproximativ 13 milioane de perechi de baze ADN de la un mamut siberian vechi de 27.000 de ani . Acest studiu a relevat o identitate de secvență de 98,5% între mamuți și elefanții africani . Studiile ulterioare efectuate de alți oameni de știință au folosit tehnici de secvențiere folosind fragmente aleatorii din genomurile complete de ADN mitocondrial și nuclear ale mamuților siberieni pentru a obține date despre genomul mamutului . Aceste studii sugerează că genomul mamutului diferă de genomul elefantului african cu doar 0,6 % . Aceste studii oferă , de asemenea, o demonstrație convingătoare a cât de stabil poate fi ADN-ul în condițiile potrivite , în special atunci când este congelat.

Poate că și mai interesante sunt asemănările detectate între genomurile mamuților și umane . De exemplu , așa cum se arată în Figura 21.13, când secvențele genelor cromozomilor umani au fost aliniate cu

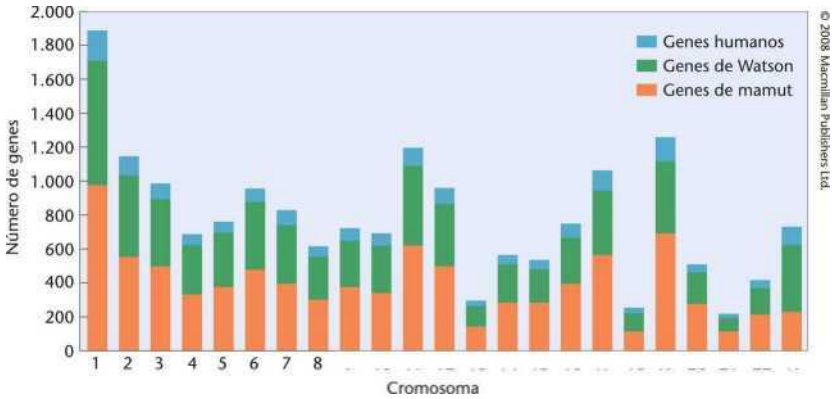


FIGURA 21.13 Gráfica que muestra el número de genes en cada cromosoma humano (azul), la fracción promedio de bases codificadoras de proteínas se alinean con las lecturas del genoma de James D. Watson obtenidas mediante Roche 454 (verde) y la fracción de bases codificadoras que se alinean con una o más lecturas del genoma del mamut (naranja), utilizando genes predichos de elefante que se hacen corresponder con el cromosoma humano basándose en la similitud de secuencias —aproximadamente el 50 por ciento de cada autosoma, pero solo el 31 por ciento del cromosoma X, debido a que el mamut empleado en este estudio era macho.

secvențele genomului mamuților , aproximativ 50% dintre genele mamuților au prezentat o aliniere a secvențelor cu genele umane existente pe autozomi. De altfel, rețineți că această figură arată și numărul relativ de gene din genomul James Watson (pe care îl vom discuta în secțiunea următoare) în comparație cu secvența de referință a genomului uman.

În secțiunea 21.6 vom discuta despre lucrările recente asupra genomului neanderthalian. Obținerea genomului unui strămoș uman de acea vârstă era anterior de neimaginat, iar aceste lucrări oferă noi indicii care ne apropie de înțelegerea evoluției umane.

La 10 ani de la proiectul HGP: care sunt următorii pași?

În cei zece ani de la finalizarea unei secvențe preliminare a genomului uman, studiile asupra genomului au continuat într-un ritm rapid. De exemplu, în timp ce proiectul HGP era în curs de finalizare , un grup de aproximativ trei duzini de echipe de cercetare din întreaga lume a lansat proiectul ENCODE (Enciclopedia Elementelor ADN). Scopul principal al ENCODE este de a utiliza atât tehnici experimentale , cât și bioinformatice pentru a identifica și analiza elementele funcționale (cum ar fi situsurile de inițiere a transcripției , promotorii și amplificatorii) care reglează exprimarea genelor umane . Înainte de ENCODE, fuseseră identificați aproximativ 532 de promotori , dar acum avem peste 775 de promotori identificați în genomul uman, fiind analizate multe alte secvențe potențiale de promotori .

Ca urmare a proiectului HGP, au apărut multe alte domenii tematice importante în domeniul cercetării genomului uman, inclusiv un proiect genomic asupra cancerului, analiza epigenomului (inclusiv un Proiect al Epigenomului Uman care creează sute de hărți ale modificărilor epigenetice în diferite tipuri de celule și țesuturi și evaluează rolurile potențiale ale epigeneticii în bolile complexe), caracterizarea polimorfismelor SNP (proiectul internațional HapMap) și variațiile CNV pentru a determina rolul acestora în variațiile genomice, boli și aplicații farmacogenomice. Am discutat deja anumite aspecte ale unui proiect genomic asupra cancerului (Proiectul Atlasul *Genomului Cancerului)* în Capitolul 19. În Capitolul Special 3, am discutat în detaliu epigenomul. SNP-urile și farmacogenomica sunt acoperite în Capitolul 22. Aici vom analiza două domenii ale genomului uman care sunt extensii ale proiectului HGP: (1) analiza genomurilor personale, inclusiv a genomurilor haploide, și (2) Proiectul Microbiomului Uman.

Proiecte de genom personalizat și genomică personală

Așa cum am explicat anterior în acest capitol și în Capitolul 20, tehnologiile de secvențiere de mare randament și, mai recent, secvențierea de ultimă generație - capabile să genereze citiri de secvențe mai lungi la viteze mai mari și cu o precizie mai mare - au redus dramatic costul secvențierii ADN-ului și se speră că reducerile de costuri vor continua odată cu progresele tehnologice ulterioare *(a se vedea* Figura 21.14). Aceste speranțe au determinat mai multe companii să propună secvențierea genomurilor personalizate pentru indivizi. În 2006, Fundația X Prize a anunțat Premiul Archon X Genomics, un premiu de 10 milioane de dolari acordat primului grup privat care a dezvoltat o tehnologie capabilă să secvențieze 100 de genomuri umane cu un grad ridicat de precizie în mai puțin de 10 zile pentru mai puțin de 10.000 de dolari per genom. Alte grupuri încearcă să secvențieze un genom personalizat pentru doar 1.000 de dolari! Două programe finanțate de Institutele Naționale de Sănătate din SUA i-au provocat pe oamenii de știință să dezvolte tehnologii de secvențiere capabile să completeze un genom uman pentru doar 1.000 de dolari până în 2014 *(a se vedea* secțiunea Genetică *, Tehnologie și Societate* din Capitolul 22).

Încercarea de a obține un genom pentru doar 1.000 de dolari a devenit un indicator al faptului că secvențierea ADN-ului ar putea deveni în cele din urmă suficient de ieftină pentru ca oamenii să ia în considerare achiziționarea unui raport despre propria amprentă genetică. Genomul lui James D. Watson, care a descoperit structura ADN - ului împreună cu Francis Crick, a fost în centrul atenției „Proiectului Jim", întreprins de compania 454 Life Sciences, cu sediul în Connecticut, care dorea să secvențieze genomul unei persoane de profil înalt și a decis că această persoană ar trebui să fie co-descoperitorul structurii ADN-ului și primul director al Proiectului Genomului Uman din Statele Unite. Această companie a folosit tehnica sa de pirosecvențiere de ultimă generație *(vezi* (Figura 21.18) pentru Proiectul Jim, iar în decurs de doi ani au anunțat că șase analize ale genomului lui Watson au fost finalizate , la un cost aproximativ de puțin sub un milion de dolari. Ulterior, i-au oferit lui James Watson un DVD care conținea secvența sa genomică.

Pionierul genomului uman , J. Craig Venter, ale cărui realizări le-am discutat deja în mai multe capitole, a reușit ca Institutul J. Craig Venter să-i finalizeze genomul și să-l depună în GenBank în mai 2007. George Church de la Harvard și colaboratorii săi au inițiat Proiectul Genomului Uman.

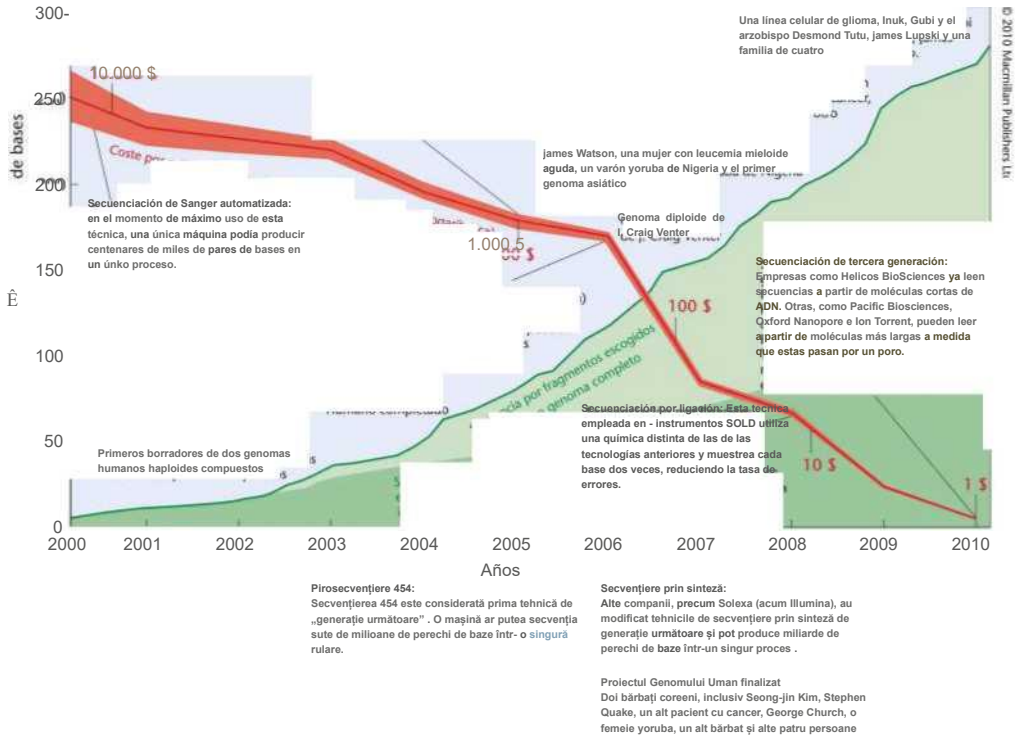

300-
250
200
150
100
50
0
de bases
Ê
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
Años
10.000 $
1.000 $
100 $
10 $
1 $
Una línea celular de glioma, Inuk, Gubi y el arzobispo Desmond Tutu, james Lupski y una familia de cuatro
james Watson, una mujer con leucemia mieloide aguda, un varón yoruba de Nigeria y el primer genoma asiático
Genoma diploide de J. Craig Venter
Secuenciación de Sanger automatizada: en el momento de máximo uso de esta técnica, una única máquina podía producir centenares de miles de pares de bases en un único proceso.
Secuenciación de tercera generación: Empresas como Helicos BioSciences ya leen secuencias a partir de moléculas cortas de ADN. Otras, como Pacific Biosciences, Oxford Nanopore e Ion Torrent, pueden leer a partir de moléculas más largas a medida que estas pasan por un poro.
Secuenciación por ligación: Esta técnica empleada en - instrumentos SOLD utiliza una química distinta de las de las tecnologías anteriores y muestrea cada base dos veces, reduciendo la tasa de errores.
Primeros borradores de dos genomas humanos haploides compuestos
Pirosecvențiere 454:
Secvențierea 454 este considerată prima tehnică de „generație următoare" . O mașină ar putea secvența sute de milioane de perechi de baze într- o singură rulare.
Secvențiere prin sinteză:
Alte companii, precum Solexa (acum Illumina), au modificat tehnicile de secvențiere prin sinteză de generație următoare și pot produce miliarde de perechi de baze într-un singur proces .
Proiectul Genomului Uman finalizat
Doi bărbați coreeni, inclusiv Seong-jin Kim, Stephen Quake, un alt pacient cu cancer, George Church, o femeie yoruba, un alt bărbat și alte patru persoane
© 2010 Macmillan Publishers Ltd

FIGURA 21.14 Explozia tehnicilor de secvențiere a genomului uman . Costurile secvențierii au scăzut constant din anul 2000, datorită inovațiilor în tehnologiile de secvențiere. Drept urmare, se observă creșterea enormă a cantității de date de secvențiere din fragmente selectate aleatoriu ale unor genomuri întregi , datele de secvențiere a genelor stocate în baze de date publice, datele de arhivă a urmelor (date brute ale secvențelor) și, acum, datele *de arhivă a citirii secvențelor (SRA) obținute folosind* tehnici de secvențiere de generație următoare - inclusiv date despre mai multe genomuri individuale.

Genomului Personal (PGP) a recrutat voluntari pentru a furniza ADN pentru secvențierea genomului individual, fiind de acord să pună datele genomice la dispoziția publicului. Genomul lui Church a fost finalizat și este acum disponibil online. Proiectul genomului personalizat ridică o întrebare evidentă: ați permite secvențierea genomului dumneavoastră pentru 10.000 de dolari, 1.000 de dolari sau chiar gratuit?

După finalizarea genomurilor Watson și Venter, prima secvență completă a genomului pentru un individ uman „antic" - un paleo-eschimos - a fost publicată în 2008. Această secvență a fost obținută din păr conservat în permafrost cu o vechime de aproximativ 4.000 de ani. Această lucrare a permis recuperarea a aproximativ 78% din genomul diploid și a dezvăluit multe SNP-uri interesante (dintre care aproximativ 7 % nu fuseseră identificate anterior). Până la începutul anului 2010, fusese raportată finalizarea a 13 secvențe genomice de la oameni individuali, inclusiv cele ale unui yoruba african, două persoane din nord-vestul Europei, un chinez Han, două persoane din Coreea, arhiepiscopul african Desmond Tutu și o familie de patru persoane , printre alții .

Un exemplu deosebit de interesant de genomică personală - implică un cercetător genetician care și-a examinat propriul genom pentru a încerca să obțină o înțelegere a unei tulburări medicale . Dr. Richard Gibbs de la Colegiul de Medicină Baylor din Texas, SUA, a condus o echipă care a secvențiat genomul complet al colegului său , Dr. James Lupski, genetician medical cu boala Charcot-Marie-Tooth (CMT). Această boală este o tulburare neurologică ce provoacă slăbiciune musculară . Interesant este că CMT implică mutații în peste 30 de gene, multe dintre ele fiind identificate de Dr. Lupski , chiar dacă nu era purtător al acestor mutații . O comparație a genomului lui Lupski cu secvența de referință pentru HGP a relevat

numeroase SNP-uri și alte variații, deși a rămas neclar dacă multe dintre acestea au fost erori de secvențiere sau variații fără legătură cu CMT.

Concentrându-se pe gene asociate anterior cu CMT și alte tulburări neurologice, cercetătorii

au descoperit că genomul lui Lupski prezenta două mutații distincte în *gena SH3TC2,* care este exprimată în celulele Schwann care înfășoară anumiți neuroni pentru a forma teaca de mielină esențială pentru conducerea impulsurilor nervoase. O mutație nonsens a fost găsită la una dintre alelele *SH3TC2 , iar* o nouă mutație missense a fost localizată în a doua alelă a SH3TC2 la Lupski. Când s-au efectuat teste genetice pentru a încerca să detecteze aceste alele la părinții și cei șapte frați ai lui Lupski, *mutația* nonsens a fost găsită la un părinte și la doi frați care nu aveau boala. Mutația missense a fost găsită la celălalt părinte și la un bunic, niciunul dintre aceștia neavând boala. Doar frații care moșteniseră ambele alele mutate aveau CMT. Mulți consideră acesta ca fiind primul succes relevant clinic al tehnicilor de secvențiere pe genomurile personale - cel puțin în ceea ce privește identificarea genelor responsabile de o boală.

Un alt aspect deosebit de benefic al proiectelor de genom personal este bogăția de informații pe care le oferă despre variația genomică. Proiectul HGP a combinat mostre de la diferite persoane pentru a crea un *genom de referință haploid* . Proiectele de genom personal secvențiază un genom diploid, iar acesta poate fi motivul pentru care astfel de proiecte indică faptul că comparațiile dintre genomurile haploide pot subestima cantitatea de variație genomică dintre indivizi cu un factor de cinci sau mai mult . De exemplu, când a fost analizat genomul lui Venter, au fost găsite peste patru milioane de variații numai între cromozomii materni și paterni . Având în vedere ceea ce aflăm despre genomurile personale , se pare că variația genomică între indivizi poate fi mai aproape de 0,5 % decât de 0,1%, iar într- un genom compus din 3 miliarde de perechi de baze , aceasta este o diferență semnificativă în ceea ce privește variația secvenței. Integrarea datelor genomice de la mai multe genomuri individuale complete corespunzătoare diferitelor grupuri etnice va fi, de asemenea, de mare folos în genetica evolutivă, pentru a aborda întrebări fundamentale despre diversitatea umană , genealogie și modele de migrație.

Proiectul Microbiomului Uman

În 2008, *Institutele Naționale de Sănătate și* -au anunțat planurile pentru Proiectul Microbiomului Uman, un proiect pe cinci ani, în valoare de 115 milioane de dolari , care vizează finalizarea genomurilor a aproximativ 600-1.000 de microorganisme - bacterii, virusuri și drojdii - care trăiesc pe sau în interiorul oamenilor . Microorganismele reprezintă 1-2 % din corpul uman, depășind numeric celulele umane cu aproximativ 10 la 1. Mulți microbi, cum ar fi *E. coli, fac parte din acest proiect* . În tractul digestiv, aceștia joacă un rol important în sănătatea noastră și, bineînțeles , alți microbi ne pot îmbolnăvi. Proiectul Microbiomului Uman are mai multe obiective principale, printre care :

- Pentru a determina dacă diferite persoane au un microbiom uman de bază comun .
- Pentru a înțelege dacă schimbările microbiomului pot fi corelate cu schimbările în starea de sănătate a oamenilor .
- de noi metode, inclusiv instrumente bioinformatice, care ajută la analiza microbiomului .
- Abordarea implicațiilor etice , juridice și sociale ale cercetării microbiomului uman . Vă sună familiar? Rețineți că luarea în considerare a aspectelor etice, juridice și sociale a fost unul dintre obiectivele proiectului HGP .

Proiectul Microbiomului Uman este încă în stadii incipiente, dar a demonstrat deja că cele peste 3,3 milioane de gene microbiene din intestinul uman care au fost caracterizate până în prezent par a fi foarte similare la peste 100 de persoane. Microbiomul salivar este, de asemenea , foarte similar între indivizi, iar din aceste două studii a fost creată o bază de date privind microbiomul oral uman , care urmărește să stabilească legături între microbiomul oral și sănătatea orală .

Fără genom nesecvențiat și proiectul Genome 10K

Fără îndoială, noile tehnologii de secvențiere dezvoltate ca urmare a proiectului HGP sunt în mare măsură responsabile pentru efectele transformatoare pe care HGP le-a avut asupra biologiei moderne. În urmă cu aproximativ zece ani , a fost nevoie de o cameră plină de secvențiatoare și de câteva milioane de dolari pentru a secvența genomului de 97 Mb al *C. elegans.* Ca semn al erei moderne în lumea genomicii , în 2009 , două secvențiatoare și 500.000 de dolari au făcut posibilă obținerea unei versiuni destul de complete a genomului de cod de 750 Mb ... într- o singură lună!

Tehnologiile moderne de secvențiere îi determină pe unii oameni să se întrebe : „Ce ați face dacă ați putea secvența totul?”. Diverse persoane din întreaga lume , inclusiv cercetători genomici și curatori de muzee , au propus secvențierea a 10.000 de genomuri de vertebrate - așa-numitul plan Genome 10K . La scurt timp după finalizarea proiectului HGP, Institutul Național de *Cercetare a Genomului Uman* Institutul Național de Cercetare a Genomului Uman (NHGRI) din Statele Unite a întocmit o listă de

mamifere și alte vertebrate ca priorități pentru secvențierea genomului, în parte datorită potențialelor beneficii ale genomicii comparative în învățarea despre genomul uman. Proiectul Genome 10K va oferi, de asemenea, date despre evoluția și speciația genomurilor. Acest plan ambițios își propune să asambleze 10.000 de genomuri în cinci ani - mai mult de cinci genomuri pe zi!

21,6

Genomica comparativă analizează și compară genomurile diferitelor organisme

Până în 2010, genomurile a peste 3.800 de organisme procariote și eucariote fuseseră deja secvențiate, inclusiv numeroase organisme model și o serie de virusuri. Acesta este un progres extraordinar într-o perioadă relativ scurtă de timp ! Printre aceste organisme se numără drojdia *(Saccharomyces cerevisiae)* - primul genom eucariot secvențiat; bacterii precum *E. coli;* nematodul *Caenorhabditis elegans;* planta cruciferă *Arabidopsis thaliana;* șoarecele *(Mus musculus);* peștele zebră *(Danio rerio);* și , bineînțeles , *Drosophila.* În ultimii ani, au fost secvențiate genomurile cimpanzeilor, câinilor, găinilor, aricilor de mare, albinelor, peștilor-balon, orezului și grâului .

Aceste studii nu numai că au demonstrat diferențe semnificative în organizarea genomului între procariote și eucariote, ci și numeroase asemănări între genomurile tuturor speciilor. În această secțiune, vom oferi o prezentare generală a organizării genomice la procariote și eucariote și vom discuta câteva aspecte interesante ale genomurilor unui număr de organisme selectate. Analiza numărului tot mai mare de secvențe genomice confirmă faptul că toate organismele vii sunt înrudite și descind dintr-un strămoș comun. Seturi similare de gene sunt utilizate în toate organismele pentru funcții celulare de bază, cum ar fi replicarea ADN-ului, transcripția și traducerea. Aceste relații genetice sunt motivul pentru care organismele model sunt utilizate pentru a studia tulburările umane moștenite, efectele mediului asupra genelor și interacțiunile genelor în bolile complexe, cum ar fi bolile cardiovasculare, diabetul, bolile neurodegenerative și tulburările de comportament .

Genomica comparativă compară genomurile diferitelor - organisme pentru a răspunde la întrebări despre genetică și alte aspecte ale biologiei . Este un domeniu cu multe aplicații practice și de cercetare, inclusiv descoperirea genelor și dezvoltarea de organisme model pentru studierea bolilor umane. De asemenea , încorporează studiul evoluției genelor și genomului , precum și relațiile dintre organisme și mediul lor. Genomica comparativă utilizează o gamă largă de tehnici și resurse, cum ar fi construirea și utilizarea bazelor de date de nucleotide și proteine care conțin secvențe de acid nucleic și aminoacizi , hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH) și crearea de animale cu gene eliminate. Genomica comparativă poate dezvălui diferențe și asemănări genetice între organisme pentru a oferi informații despre modul în care aceste diferențe contribuie la diferențele de fenotip, ciclu de viață și alte atribute, precum și pentru a determina istoria evolutivă a acestor diferențe genetice.

Genomurile procariote și eucariote prezintă caracteristici structurale comune, împreună cu diferențe importante.

Întrucât majoritatea procariotelor au genomuri mici, care sunt foarte convenabile pentru clonare și secvențiere prin fragmente selectate aleatoriu , multe proiecte genomice s-au concentrat pe procariote, iar în prezent există peste 900 de proiecte suplimentare în curs de desfășurare pentru secvențierea genomurilor procariote. Multe dintre genomurile procariote deja secvențiate aparțin unor organisme care cauzează boli umane, cum ar fi holera , tuberculoza și lepra. În mod tradițional, se considera că genomul bacterian este relativ mic (mai puțin de 5 Mb) și conținut într -o singură moleculă circulară de ADN . E. *coli.* Folosit ca organism model bacterian prototip în genetică, acesta are un genom cu aceste caracteristici. Cu toate acestea, avalanșa de informații genomice disponibile acum a pus sub semnul întrebării validitatea acestei perspective pentru bacterii în general (Tabelul 21.2). Deși majoritatea genomurilor procariote sunt mici, dimensiunile lor variază într-un interval surprinzător de larg. De fapt , există o oarecare suprapunere în ceea ce privește dimensiunile între cele mai mari genomuri bacteriene (30 Mb în *Bacillus megaterium)* și cele mai mici genomuri eucariote - (12,1 Mb în drojdie). Numărul de gene din genomurile bacteriene variază, de asemenea , foarte mult , de la mai puțin de 500 la peste 5.000 de gene - o diferență de un ordin de mărime.

În plus, deși multe bacterii au un singur cromozom circular, există variații considerabile în organizarea și numărul cromozomilor între diferitele specii bacteriene . Se identifică un număr tot mai mare de genomuri compuse din molecule liniare de *ADN* , inclusiv genomul Borrelia burgdorferi .

TABLA 21.2 Studiul genomului și al numărului de gene din procariotele selectate

	Dimensiunea genomul (Mb)	numărului al genelor
Archee		
Metanosarcina berkeri	4,84	3.680
Archaeoglobus fulgid este	2.17	2.437
Metanococcus jannaschii	1,66	1.783
Nanoarchaeum equitans	0,49	552
Thermoplasma acidophilium	1,56	1.509
Eubacterii		
Pseudomonas aeruginosa	6.30	5.570
Rhizobium radiobacter	4,67	5.419
Escherichia coli	4,64	4.289
Bacillus subtilis	4,21	4.779
Haemophilus influenzae	1,83	1.738
Aquifex aeolicus	1,55	1.749
Rickettsia prowazekii	1,11	834
Pneumonia cu Mycoplasma	0,82	680
Mycoplasma genitalium	0,58	483

Organismul care provoacă boala Lyme, numită și borrelioză. Secvențierea genomului Vibrio *cholerae* (organismul responsabil pentru holeră) a relevat prezența a doi cromozomi circulari . Alte bacterii ale căror genomuri au doi sau mai mulți cromozomi includ *Rhizobium radiobacter* (numit anterior *Agrobacterium tumefaciens) și Deinococcus radiodurans.* și *Rhodobacter sphaeroides.* Descoperirea faptului că unele specii bacteriene au cromozomi multipli ridică întrebări despre modul în care replicarea și segregarea cromozomilor lor sunt coordonate în timpul diviziunii celulare și despre mecanismele de reglare genetică încă nedescoperite care ar putea exista la bacterii. Răspunsurile la aceste întrebări pot oferi indicii despre evoluția genomurilor eucariote multicromozomiale.

Putem face două generalizări despre organizarea genelor care codifică proteine la bacterii . În primul rând , densitatea genelor este foarte mare, în medie cu o genă per kilobază de ADN. De exemplu, genomul tulpinii K12 de *E. coli,* care în 1997 a fost al doilea genom procariot secvențiat , are o dimensiune de 4,6 Mb și conține 4.289 de gene care codifică proteine pe unicul său cromozom circular. Această împachetare densă a genelor în genomurile procariote implică faptul că o proporție foarte mare din ADN (aproximativ 85 până la 90 %) funcționează ca ADN codificator. De obicei, doar o mică parte a genomului bacterian este compusă din ADN necodificator, adesea sub formă de secvențe reglatoare sau elemente transpozabile , care se pot deplasa dintr-o locație în alta în cadrul genomului.

A doua generalizare pe care o putem face este că genomurile bacteriene conțin operoni (reamintim din Capitolul 16 că operonii conțin mai multe gene care funcționează ca o singură unitate transcripțională și ale căror produse proteice fac parte dintr-o cale biochimică comună). La *E. coli,* 27 % din totalul genelor sunt conținute în operoni (aproape 600 de operoni). În alte genomuri bacteriene , organizarea genelor în unități transcripționale pune *sub* semnul întrebării ideile existente despre natura operonilor . De exemplu , în Aquifex *aeolicus* , O unitate de transcripție poligenică conține șase gene implicate în mai multe procese celulare distincte , care nu au nicio legătură aparentă între ele : două gene pentru recombinarea ADN -ului , una pentru sinteza lipidelor , una pentru sinteza acizilor nucleici , una pentru sinteza proteinelor și una care codifică o proteină a motilității celulare . Alte unități de transcripție poligenice din această specie conțin, de asemenea, gene cu funcții foarte diferite . Această descoperire, combinată cu rezultate similare obținute în alte proiecte genomice , ridică întrebări interesante despre consensul existent conform căruia operonii codifică produse care controlează o singură cale metabolică în celulele bacteriene .

Caracteristicile de bază ale organismelor eucariote sunt similare la diferite specii, deși dimensiunea genomului la eucariote este foarte variabilă (Tabelul 21.3). Dimensiunea genomului variază de la aproximativ 10 Mb la ciuperci la peste 100.000 Mb la unele angiosperme (o variație de patru ordine de mărime); numărul de cromozomi per genom variază de la două la câteva sute (o variație de două ordine de mărime), dar numărul de gene variază mult mai puțin decât dimensiunea genomului sau numărul de cromozomi .

Genomurile eucariote au câteva caracteristici care nu se regăsesc la organismele procariote:

- Densitatea genelor. La procariote , densitatea genelor este apropiată de o genă pe kilobază. În genomurile eucariote , există o gamă largă de densități genice . La drojdie, există aproximativ 1 genă/2 kb; la *Drosophila,* Aproximativ 1 genă/13 kb se găsește pe cromozomi, iar la oameni , densitatea genelor variază enorm de la un cromozom la altul . Cromozomul 22 uman are aproximativ 1 genă/64 kb, în timp ce cromozomul 13 are 1 genă /155 kb de ADN.
- Introni. Majoritatea genelor eucariote conțin introni. Există o variație mare între genomi în ceea ce privește numărul de introni pe care îi conțin , precum și o variație mare de la o genă la alta . Genomul complet al drojdiei are doar 239 de introni, în timp ce o singură genă

TABLA 21.3 Comparación de varios genomas seleccionados

Organismo (nombre científico)	Tamaño aproximado del genoma (en millones [megabase, Mb] o miles de millones [gigabase, Gb] de bases) (fecha de terminación)	Número de genes	Porcentaje aproximado de genes compartido con los seres humanos
Bacteria *(Escherichia coli)*	4,1 Mb (1997)	4.403	No determinado
Gallina *(Callus gallus)*	1 Gb(2004)	“20.000-23.000	60%
Perro *(Canis fa miliar is)*	2,5 Gb(2003)	-18.400	75%
Chimpancé *(Pan troglodytes)*	-3Gb(2005)	“20.000-24.000	98%
Mosca de la fruta *(Drosophila melanogaster)*	165 Mb (2000)	“13.600	50%
Ser humano *(Homo sapiens)*	~2,9 Gb(2004)	“20.000	100%
Ratón *(Mus musculus)*	-2,5 Gb(2002)	“30.000	80%
Rata *(Rattus norvegicus)*	-2,75 Gb (2004)	“22.000	80%
Macaco rhesus *(Macaca mulatta)*	2,87 Gb(2OO7)	“20.000	93%
Arroz *(Oryza sativa)*	389 Mb (2005)	-41.000	No determinado
Nematodo *(Caenorhabditis elegans)*	97 Mb (1998)	19.099	40%
Erizo de mar *(Stron&locentrotus purpura tus)*	814 Mb (2006)	“23.500	60%
Oruga (planta) *(Arabidopsis thaliana)*	140 Mb (2000)	“27.500	No determinado
Levadura *(Saccharomyces cerevisiae)*	12 Mb (1996)	-5.700	30%

Adaptado de Palladino, M. A. *Understanding the Human Cenóme Project, 2ª* ed. Benjamin Cummings, 2006. Nota: miles de millones de pares de bases (gigabase, Cb).

Genomul uman poate conține peste 100 de introni . În ceea ce privește dimensiunea intronilor, la organismele eucariote, această dimensiune este în general corelată cu dimensiunea genomului. Genomurile mai mici au, în medie, introni mai mici, în timp ce genomurile mai mari au dimensiuni medii ale intronilor mai mari. Există însă excepții: de exemplu, genomul peștelui-balon *(Fugu rubripes)* are relativ puțini introni.

- Secvențe repetitive. Prezența intronilor și existența secvențelor repetitive sunt cele două motive principale care justifică gama largă de dimensiuni ale genomului la organismele eucariote. La unele plante, cum ar fi porumbul, secvențele repetitive sunt caracteristica predominantă a genomului. Genomul porumbului are aproximativ 2.500 Mb de ADN, iar mai mult de două treimi din acest genom este compus din ADN repetitiv . La oameni, așa cum s-a explicat anterior, aproximativ jumătate din genom este ADN repetitiv.

Genomica comparativă oferă informații noi despre genomurilor organismelor model și ale genomului uman

Așa cum am menționat anterior, Proiectul Genomului Uman a secvențiat, de asemenea, genomurile unui număr de organisme model non-umane, inclusiv *E. coli, Arabidopsis thaliana, Saccharomyces cerevisiae, Drosophila melanogaster,* nematodul *Caenorhabditis elegans* și șoarecele *Mus musculus.* Secvențele genomice complete ale acestor organisme s-au dovedit extrem de utile pentru studiile de genomică comparativă ale funcției genelor la aceste organisme și la oameni. După cum se arată în tabelul 21.3, numărul de gene pe care oamenii le au în comun cu alte specii este foarte mare, variind de la aproximativ 30 % din genele de drojdie la 80% la șoareci și 98 % la cimpanzei . Genomul uman conține chiar și aproximativ 100 de gene care sunt prezente și în multe bacterii. Genomica comparativă ne-a arătat că multe gene mutate implicate în bolile umane sunt prezente și în organismul nostru model. De exemplu, aproximativ 60% din genele mutate în aproape 300 de boli umane se găsesc și în *Drosophila.* Acestea includ gene implicate în cancerele de prostată, colon și pancreas; în bolile cardiovasculare; în fibroza chistică și în alte câteva boli . Aici vom explica modul în care studiile de genomică comparativă ale diferitelor organisme model (câini, cimpanzei, maimuțe rhesus și arici de mare) și ale genomului neanderthalian au dezvăluit date interesante despre genomul uman.

Genomul câinelui

În 2005 , genomul „celui mai bun prieten al omului” a fost finalizat, dezvăluind că avem în comun aproximativ 75 % din gene cu câinii *(Canis*

familiaris). care a furnizat un model util cu care să studiem propriul nostru genom (Figura 21.15). Câinii au un genom de dimensiuni similare cu genomul uman : aproximativ 2,5 miliarde de perechi de baze, estimat a conține aproximativ 18.400 de gene (Figura 21.15(a)). Câinele oferă mai multe avantaje pentru studierea bolilor ereditare la oameni. Câinii au în comun multe tulburări genetice cu oamenii, inclusiv peste 400 de tulburări monogenice, aneuploidii ale cromozomilor sexuali, boli multifactoriale (cum ar fi epilepsia), tulburări de comportament (cum ar fi tulburarea obsesiv-compulsivă) și predispoziții genetice la cancer, orbire, boli cardiovasculare și surditate. Cauzele moleculare a cel puțin 60% din bolile ereditare la câini, cum ar fi mutațiile punctuale și delețiile, sunt similare sau identice cu cele găsite la oameni. În plus, cel puțin 50 % din tulburările genetice la câini sunt specifice rasei . Prin urmare, rasa segregă alela mutantă într- un mediu genetic relativ omogen . Câinii de rasă pură seamănă cu populațiile umane izolate prin faptul că au un număr mic de fondatori și prezintă o lungă perioadă de izolare genetică relativă. Aceste proprietăți fac ca acești câini de rasă pură să fie utili ca model pentru tulburările genetice din specia umană.

În plus, diferențele biologice și comportamentale dintre diferitele rase de câini sunt bine documentate. Câinii domestici prezintă o variație mult mai mare a dimensiunii corpului decât orice alt vertebrat.

(a) **(b)**

FIGURA 21.15 (a) Caracteristici de bază ale genomului câinelui, (b) Un Chihuahua lângă un Dog dog german, care este de peste 50 de ori mai mare. Analiza genomului câinelui permite oamenilor de știință să determine baza genetică a variatelor fenotipuri pe care le prezintă câinii, cum ar fi dimensiunea corpului.

(a)

Tamaño: 2,47 Gb

Cromosomas: 39

Número de ORF: 19.300

ADN repetitivo: 31 %

Diferența de dimensiune dintre un Chihuahua și un Dog dog german este un exemplu excelent [Figura 21.15(b)]. Cartografierea și compararea diferențelor în secvențele de ADN (polimorfisme) între diferite rase de câini poate ajuta la identificarea genelor care contribuie atât la diferențele fiziologice , cât și la cele comportamentale . De exemplu, în 2007, analiza întregului genom al diferitelor rase de câini de talie mică și mare a relevat un locus pe cromozomul 15 unde a fost detectat un polimorfism cu un singur nucleotid în gena factorului de creștere asemănător insulinei 1 *(IGfL)* . Este destul de comună la toate rasele *de* câini mici, dar este practic absentă la câinii mari . Este bine cunoscut faptul că Igfl Joacă un rol important în creșterea masei musculare și ososase, reglată de hormonul de creștere, în timpul adolescenței la *oameni* . Acest studiu oferă dovezi foarte puternice că mutația Igfl este unul dintre principalii factori determinanți ai dimensiunii corporale la câinii de talie mică .

Crescătorii de câini folosesc acum teste genetice pentru a detecta bolile ereditare la animalele lor, pentru a determina culoarea blănii la Labrador Retriever și Pudel și pentru a evalua lungimea blănii la Mastiffi . Fără îndoială , ne putem aștepta ca mult mai multe teste genetice să fie efectuate pe câini în viitorul apropiat , inclusiv analiza ADN-ului pentru a determina dimensiunea, tipul de cozi , viteza, simțul mirosului și alte trăsături pe care crescătorii și proprietarii le consideră importante.

Genomul cimpanzeului

Deși genomul cimpanzeului (Pan *troglodytes)* nu a făcut parte din proiectul HGP, secvența sa de nucleotide a fost finalizată în 2004. Per total, secvențele genomului cimpanzeului și celui uman diferă cu mai puțin de 2 %, iar 98 % dintre gene sunt aceleași. Comparațiile dintre aceste genomuri oferă câteva perspective interesante asupra a ceea ce face ca unele primate să fie umane și altele să fie cimpanzei.

Evenimentele de speciație care au separat oamenii și cimpanzeii au avut loc acum mai puțin de 6,3 milioane de ani. Anafizele genomice indică faptul că aceste specii au divergit inițial , dar apoi au făcut din nou schimb de gene înainte de a se separa complet. Evoluția lor separată din acest moment este evidentă în diferențe - precum cele observate în secvența cromozomului 22 al cimpanzeului și a ortologului său uman, cromozomul 21 (Tabelul 21.4; cimpanzeii au 48 de cromozomi , iar oamenii doar 46, de unde și numerotarea diferită). Acești cromozomi au acumulat substituții de nucleotide în valoare totală de 1,44 % din secvență . Cea mai surprinzătoare diferență este descoperirea ...

TABLA 21. ■ Comparație între cromozomul 21 uman și cromozomul 22 al cimpanzeului

	Om 21	Cimpanzeu 22
Dimensiune (pb)	33.127.944.32.799.845	
% conținut C + C	40,94	41,01
Insulele CpG	950885	
elemente *Alu)*	15.13715.048	
Genele	284272	
Pseudogene	98	89

Există 68.000 de inserții sau deleții de nucleotide, numite colectiv indel-uri, în cromozomii cimpanzeilor și ai oamenilor , reprezentând o *frecvență de un indel la 470 de baze. Multe dintre acestea sunt* inserții Alu pe cromozomul 21 uman . Deși diferența generală în secvența de nucleotide este mică, există diferențe semnificative în genele pe care le codifică. Doar 17% dintre genele analizate codifică proteine identice pe ambii cromozomi; celelalte 83 % codifică gene cu unul sau mai multe diferențe de aminoacizi .

Momentul și localizarea expresiei genelor joacă, de asemenea, un rol major în distingerea celor două specii de primate . Folosind cipuri ADN (explicate în Secțiunea 21.8) , cercetătorii au comparat modelele de expresie a 202 gene în celulele cerebrale și hepatice umane și de cimpanzeu. Aceștia au descoperit mai multe diferențe specifice speciei în expresia genelor cerebrale decât în expresia genelor hepatice. Pentru a examina aceste diferențe mai detaliat, Svante Pääbo și colegii săi au comparat expresia a 10.000 de gene în creierele cimpanzeilor și umane și au descoperit că 10% dintre genele examinate diferă în expresie într - una sau mai multe regiuni ale creierului . Și mai semnificativ , aceste diferențe au fost asociate cu gene situate în regiuni ale genomului uman care au fost duplicate de la divergența dintre oameni și cimpanzei . Această constatare indică faptul că evoluția genomică, speciația și expresia genelor sunt interconectate. Studiile viitoare ale acestor duplicări de segmente și ale genelor pe care le conțin ar putea ajuta la identificarea genelor care contribuie la caracteristicile noastre umane.

Genomul macacului rhesus

Macacul rhesus *(Macaca mulatta),* o altă primată, a servit ca unul dintre cele mai importante organisme model în cercetarea biomedicală. Macacii au jucat un rol central în a ne ajuta să înțelegem bolile cardiovasculare, îmbătrânirea, diabetul , cancerul, depresia, osteoporoza și multe alte aspecte ale sănătății umane. Aceștia au fost esențiali în efectuarea cercetărilor privind vaccinurile împotriva SIDA și în dezvoltarea vaccinurilor împotriva poliomielitei . Genomul macacului este primul genom de maimuță care a fost secvențiat. Unul dintre principalele motive pentru care geneticienii sunt atât de entuziasmați de finalizarea acestui proiect de secvențiere este că macacii oferă o fereastră evolutivă mai îndepărtată , ideală pentru compararea și analizarea genomului uman și al cimpanzeilor . Așa cum am discutat în secțiunea anterioară , oamenii și cimpanzeii au avut un strămoș comun acum aproximativ 6 milioane de ani . Dar macacii s-au îndepărtat de linia maimuțelor care a dus în cele din urmă la cimpanzei și oameni acum aproximativ 25 de milioane de ani. Prin urmare, genomurile macacilor și oamenilor au divergit mai mult, după cum o demonstrează identitatea secvențelor de aproximativ 93 % dintre oameni și macaci, comparativ cu identitatea de 98 % comună oamenilor și cimpanzeilor .

Genomul macacului a fost publicat în 2007 și nu a fost surprinzător faptul că acesta era format din 2,87 miliarde de perechi de baze (similar cu dimensiunea genomului uman), conținute în 22 de cromozomi (20 de autozomi, unul X și unul Y) cu 20.000 de gene care codifică proteine . Deși analizele comparative ale acestui genom sunt încă în curs de desfășurare, au fost deja descoperite unele caracteristici interesante. Ca și la oameni , aproximativ 50 % din genom este compus din elemente repetitive (transpozoni, LINE, SINE). Duplicațiile genelor și familiile de gene sunt abundente, inclusiv familii de gene legate de cancer , care se găsesc și la oameni.

Am avut, de asemenea, câteva surprize interesante . De exemplu, reamintiți-vă din capitolul 4 și din alte părți ale cărții explicațiile noastre despre boala genetică fenilcetonurie (PKU), o tulburare moștenită autosomal recesivă în care oamenii nu pot metaboliza aminoacidul fenilalanină din cauza unei mutații în gena fenilalanin hidroxilazei (PAH) . Substituția histidinei codificată de o mutație în gena *PAH* la oamenii cu PKU apare ca un aminoacid de tip sălbatic în proteina macacilor sănătoși . Analizele ulterioare ale genomului macacului și compararea acestuia cu cel al oamenilor și cimpanzeilor vor fi extrem de utile geneticienilor care studiază variațiile genetice care au jucat un rol în evoluția primatelor .

Genomul ariciului de mare

În 2006, cercetătorii de la *Consorțiul pentru Secvențierea Genomului Ariciului de Mare* au finalizat genomul ariciului de mare *Strongylocentrotus purpuratus* [prezentat în Figura 21.23(a)], care constă din 814 milioane de perechi de baze.

Aricii de mare sunt nevertebrate marine de apă puțin adâncă care au servit ca organisme model importante, în special pentru biologii specializați în studiul dezvoltării. Un motiv pentru aceasta este că ariciul de mare este un deuterostom necordat, în timp ce oamenii, împreună cu măduva spinării, sunt deuterostomi cordați. Registrele fosile indică faptul că aricii de mare au apărut la începutul perioadei cambriene , acum aproximativ 520 de milioane de ani.

Pentru a completa genomul ariciului de mare , s-a utilizat o combinație de secvențiere prin fragmente selectate aleatoriu ale întregului genom și cartografiere a clonării pe cromozomii BAC . Se estimează că aricii de mare au 23.500 de gene, inclusiv gene reprezentative pentru aproape toate familiile majore de gene ale vertebratelor . Alinierea secvențelor și căutările de omologi arată că ariciul de mare conține multe gene cu funcții importante la oameni. Interesant este însă că ariciului de mare îi lipsesc gene de mare importanță la muște și viermi, cum ar fi anumite gene din superfamilia citocromului P-450 implicate în descompunerea compușilor toxici. Genomul ariciului de mare are, de asemenea, o abundență mare (25 până la 30%) de pseudogene - rude nefuncționale ale genelor care codifică proteine (vom întâlni din nou pseudogene în subsecțiunea următoare). Ariciul de mare are o dimensiune medie a intronului mai mică decât specia umană , ceea ce susține tendința generală relevată de genomica comparativă, în sensul că dimensiunea intronilor este corelată cu dimensiunea totală a genomului.

O altă tendință genomică pe care aricii de mare o au în comun cu alte eucariote este prezența genelor implicate în sistemul imunitar înnăscut, mecanismul inerent de apărare care oferă protecție cu spectru larg împotriva multor agenți patogeni. Aricii de mare au un număr foarte mare de gene care asigură imunitate înnăscută. De exemplu, o categorie foarte importantă de gene ale imunității înnăscute, receptorii de tip Toll (TLR), produc proteine transmembranare care sunt esențiale pentru recunoașterea agenților patogeni în aproape toate tipurile de celule ale vertebratelor. Aricii de mare au peste 200 de gene *TLR* , comparativ cu cele 11 găsite la oameni . Abundența acestor gene și a altor gene importante ale imunității înnăscute la aricii de mare a dus la descrierea acestor gene drept „defensomul" ariciului de mare . Această caracteristică a aricilor de mare poate ajuta la explicarea motivului pentru care aceste organisme s-au adaptat atât de bine la mediile încărcate de agenți patogeni de pe fundul mării.

Aricii de mare au aproape 1.000 de gene pentru detectarea - luminii și a mirosurilor, indicând capacități senzoriale extrem de dezvoltate. În acest sens, genomul lor este mai tipic vertebratelor decât nevertebratelor . Mai mulți ortologi ai genelor umane implicate în auz și echilibru sunt prezenți la aricii de mare , precum și mulți ortologi asociați cu boli umane , inclusiv protein kinaze, GTPaze, factori de transcripție , TLR-uri , transportori și receptori ai lipoproteinelor cu densitate mică . Aricii de mare și oamenii au în comun aproximativ 7.000 de ortologi. Un alt aspect interesant al proiectului genomului ariciului de mare este acela că a permis identificarea unor gene considerate anterior specifice vertebratelor . De exemplu , gena IVnfA , importantă pentru configurarea în timpul dezvoltării embrionare , așa cum s - a discutat în Capitolul 18 , se credea că lipsește la deuterostomii non - vertebratele . Genomul ariciului de mare conține , de asemenea , gene care nu sunt prezente la cordate . Se așteaptă ca analizele viitoare ale genomului ariciului de mare să aducă contribuții semnificative la înțelegerea tranzițiilor evolutive dintre nevertebrate și vertebrate .

Genomul neanderthalian și oamenii moderni

La începutul anului 2009, o echipă de oameni de știință condusă de Svante Pääbo de la Institutul *Max Planck pentru Antropologie Evoluționară* în Germania, 454 Life Sciences a raportat finalizarea unei prime versiuni a genomului neanderthalian *(Homo neanderthalensis)* , cuprinzând peste 3 miliarde de perechi de baze de ADN neanderthalian și reprezentând aproximativ două treimi din genom. Anterior, în 1997, laboratorul lui Pääbo a secvențiat porțiuni de ADN mitocondrial dintr-o fosilă de neanderthal . La sfârșitul anului 2006, grupul lui Pääbo , împreună cu mai mulți oameni de știință din Statele Unite, a publicat prima secvență de 65.000 de perechi de baze de ADN nuclear izolată din probe osoase ale unui neanderthalian din Croația . Oasele a trei femei care au trăit în peștera Vindija din Croația acum aproximativ 38.000 și 44.000 de ani au fost folosite pentru a obține secvența preliminară a genomului nuclear neanderthalian .

Întrucât neanderthalienii sunt membri ai familiei umane și rude mai apropiate de oameni decât cimpanzeii, se așteaptă ca genomul neanderthalian să ofere o oportunitate fără precedent de a utiliza genomica comparativă pentru a îmbunătăți înțelegerea relațiilor evolutive dintre oamenii moderni și strămoșii noștri. În special , oamenii de știință sunt interesați să identifice zonele genomului în care oamenii au suferit o evoluție rapidă de la separarea (divergența) de neanderthalieni . O mare parte din această analiză implică adoptarea unei abordări genomice comparative pentru a compara genomul neanderthalian cu cel al oamenilor și cimpanzeilor .

Genomul uman și cel al omenirii de Neanderthal sunt identice în proporție de 99%. Genomica comparativă a identificat 78 de secvențe care codifică proteine la oameni , care par să fi apărut de la divergența față de neanderthalieni și care ar fi putut ajuta oamenii moderni să se adapteze. Unele dintre aceste secvențe sunt legate de dezvoltarea cognitivă și motilitatea spermatozoizilor. Dintre numeroasele gene comune acestor specii, *FOXP2* este o genă care a fost asociată cu capacitatea de vorbire și limbaj. Există multe gene care influențează vorbirea, așadar această descoperire nu implică faptul că neanderthalienii vorbeau așa cum vorbim noi. Dar, din moment ce neanderthalienii au aceeași genă *FOXP2* ca și oamenii moderni, oamenii de știință au speculat dacă neanderthalienii posedau abilități lingvistice.

Un studiu din 2008 asupra genomului mitocondrial al omului de Neanderthal, realizat de echipa lui Pääbo, a generat 39 de milioane de citiri de secvențe , cu o lungime medie de 69 de perechi de baze. Dintre cele 16.568 de nucleotide prezente în ADN-ul mitocondrial al oamenilor moderni, o medie de 206 diferă de cele ale neanderthalienilor. Aceste diferențe se află în afara intervalului de variație întâlnit la oamenii moderni și au determinat echipa de cercetare să estimeze că cel mai comun punct ancestral , data divergenței dintre cele două linii de ADN mitocondrial , este acum 660.000 de ani (±140.000). Acest studiu oferă, de asemenea, observații interesante despre raporturile de aminoacizi dintr-o serie de enzime cheie din lanțul de transport al electronilor mitocondriali.

Descoperirea faptului că oamenii moderni și neanderthalienii au coexistat până acum doar 30.000 de ani a dus la speculații cu privire la posibilele interacțiuni care ar fi putut avea loc între neanderthalieni și oamenii moderni. Studiile genomice sugerează că încrucișările dintre neanderthalieni și oamenii moderni au avut loc acum aproximativ 45.000 până la 80.000 de ani în estul Mediteranei. De fapt, genomul lui *Homo sapiens* non-african conține aproximativ 1-4 % din secvența sa moștenită de la neanderthalieni . Aceste studii interesante, considerate anterior imposibile, au ramificații în multe domenii ale evoluției umane și va fi cu siguranță interesant de urmărit progresul acestor cercetări.

Genomica comparativă este utilă pentru studierea evoluției și funcției familiilor multigenice.

Genomica comparativă s-a dovedit, de asemenea, foarte utilă pentru identificarea membrilor familiilor multigenice , grupuri de gene care au în comun secvențe de ADN similare, dar nu identice, datorită duplicării și descendenței dintr-un strămoș comun . Produșii lor - genetici au frecvent funcții similare , iar genele sunt de obicei, deși nu întotdeauna, situate în același locus cromozomial. Un grup de familii multigenice înrudite se numește superfamilie. Datele secvențiale din proiectele genomice oferă dovezi că există familii multigenice în multe , dacă nu în toate , genomurile . Pentru a ilustra modul în care analiza familiilor multigenice oferă informații despre evoluția și funcția genomurilor eucariote , vom examina acum superfamilia genei globinei , ai cărei membri codifică lanțuri polipeptidice foarte similare , dar nu identice, cu funcții strâns legate . Alte superfamilii genetice bine caracterizate sunt cele ale histonei, tubulinei , actinei și imunoglobulinelor (anticorpi) .

Reamintim că paralogii, pe care i-am definit în Secțiunea 21.3, sunt gene omoloage prezente în același organism despre care se crede că au evoluat prin duplicație genică. Genele globinei , care codifică polipeptidele moleculelor de hemoglobină , sunt o superfamilie multigenică de paralogi care au apărut prin duplicație și dispersare , ocupând în cele din urmă situsuri cromozomiale diferite. Unul dintre cele mai bine studiate exemple de evoluție a familiilor de gene este superfamilia genei globinei (Figura 21.16). În această familie , o genă ancestrală care codifică o proteină - transportoare de oxigen s-a duplicat acum aproximativ 800 de milioane de ani , producând două gene surori , dintre care una a evoluat în gena mioglobinei actuale . Mioglobina este o proteină transportoare de oxigen care se găsește în mușchi . Cealaltă genă a suferit o duplicație și o divergență ulterioară acum aproximativ 500 de milioane de ani și a format prototipurile genelor α- globinei și β-globinei . Aceste gene codifică proteinele găsite în hemoglobină , molecula transportoare de oxigen a globulelor roșii. În ultimii 200 de milioane de ani , în cadrul acestor gene au avut loc duplicații suplimentare . O serie de evenimente care au urmat fiecărei duplicații au dispersat aceste subfamilii de gene pe diferiți cromozomi, iar acum fiecare se află pe un cromozom separat în cadrul genomului uman. Modele similare de evoluție sunt observate și în alte familii de gene , inclusiv familia de protează tripsină-chimotripsină , genele selectoare homeotice ale animalelor și familia de pigmenți vizuali ai rodopsinei .

Hemoglobina adultă este un tetramer care conține două polipeptide α și două *β* (vezi Figura 14.20 pentru structura hemoglobinei) . Fiecare polipeptidă încorporează o grupare hem care se leagă reversibil de oxigen . Grupul de gene α - globinei se află pe cromozomul 16 și grupul de

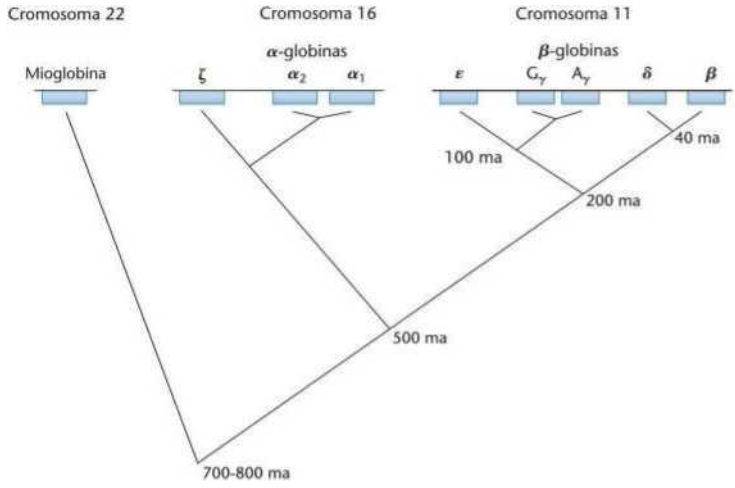


FIGURA 21.16 Istoricul evolutiv al superfamiliei genelor globinei. Un eveniment de duplicație într-o genă ancestrală a dat naștere la două linii celulare diferite între 700 și 800 de milioane de ani în urmă. Una dintre linii celulare a condus la gena mioglobinei, care este situată pe cromozomul 22 la oameni; cealaltă a suferit un al doilea eveniment de duplicație acum aproximativ 500 de milioane de ani, dând naștere strămoșilor subfamiliilor de gene α-globinei și β-globinei. O serie de duplicații care au început acum aproximativ 200 de milioane de ani au format subfamiliile de gene β-globinei. La oameni, genele α-globinei sunt situate pe cromozomul 16 , iar genele β-globinei pe cromozomul 11 .

Genele γ -globinei de pe cromozomul 11 prezintă similarități între secvențele lor de nucleotide și aminoacizi (Figura 21.17), dar cel mai mare grad de similaritate a secvențelor este cel care există în cadrul subfamiliilor în sine.

Subfamilia genei α-globinei [Figura 21.18(a)] conține trei gene: gena Σ (zeta) , care este exprimată doar în timpul embriogenezei timpurii, și două copii ale genei α, care este exprimată în timpul stadiilor fetal (atj) și adult (a2). În plus, grupul conține două pseudogene (similare cu Σ și aj), care în această familie sunt desemnate prin prefixul i// (psi) urmat de simbolul genei cu care se aseamănă cel mai mult. Astfel, denumirea i// indică o pseudogenă a genei α fetale .

Organizarea membrilor subfamiliei α - globinei și poziția intronilor și exonilor acestora prezintă câteva trăsături caracteristice [Figura 21.18(a)]. În primul rând , așa cum este tipic la eucariote, ADN-ul care codifică cele trei gene funcționale ale α-globinei ocupă doar o mică porțiune din regiunea de 30 kb care conține subfamilia . Majoritatea ADN -ului din această regiune este ADN spacer .

V-LSPADKTNVKA cu adâncime a
/3 adâncimi VHLTPEEKSAVTA

adâncime a ---- GSAQVKGHGK

/3 adâncimi AVMGNPKVKAHGK

adâncime a LLSHCLLVTLAAH

/3 adâncimi LLGNVLVCVLAHH
AWGKVGAHAGEYGAEALER
NVDEVGGEALCR

KVADALTNAVAHVDDMPNA
LGAFSDGLAH LDN LKGT

MFLSFPTTKTYFPHF-DLSH L
LVVYPWTQRF FE SFGDLST

LWGKV--LSAL SDLHAHKLRVDPVN
FATL S E LHCDKLHVDPEN

KV VSTVLTSKYR141 aminoácidos
V ANAL A H K Y H 146 aminoácidos

Declarație de responsabilitate privind protecția datelor

FIGURA 21.17 Secvențele de aminoacizi ale proteinelor α- și β-globinei sunt prezentate folosind abrevierile cu o singură literă pentru aminoacizi *(vezi* Figura 15.16). Zonele umbrite indică aminoacizi identici. Cele două proteine diferă ușor în lungime . α-globina conține 141 de aminoacizi, în timp ce β- globina conține 146. Lacunele dintre cele două secvențe, reprezentând zone care nu se aliniază, sunt indicate prin liniuțe orizontale (-).

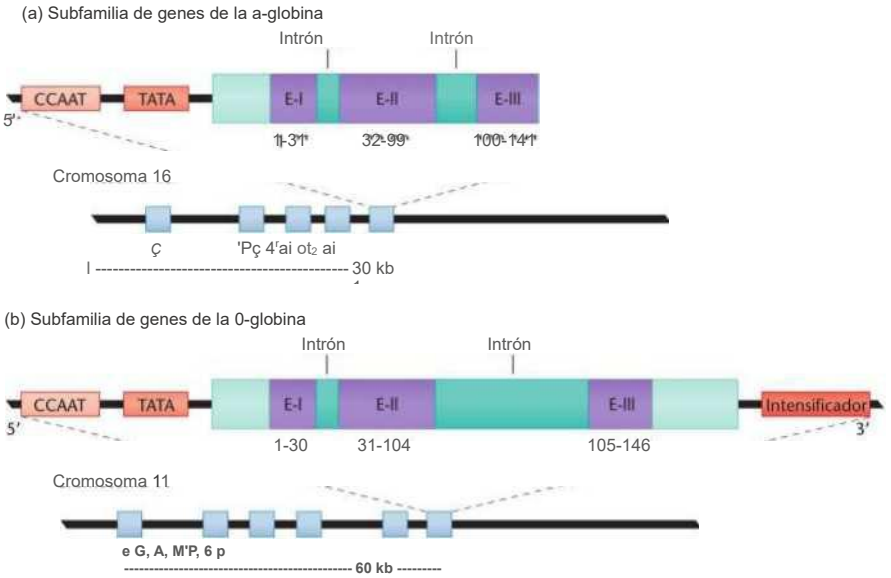


FIGURA 21.18 Organizarea (a) subfamiliei de gene x-globină pe cromozomul 16 şi (b) subfamiliei β- globină pe cromozomul 11. Organizarea internă a genei α şi a genei *β* este, de asemenea, prezentată în fiecare caz . respectiv. Ambele gene conţin trei exoni (E1, E1, E3) şi doi introni. Numerele de sub exoni indică locaţia aminoacizilor în produsul genic codificat de fiecare exon.

Intergenică. În al doilea rând , fiecare genă funcţională din această subfamilie conţine doi introni situaţi exact în aceleaşi poziţii. În al treilea rând, secvenţele nucleotidice din exonii corespunzători sunt aproape identice în genele { şi a. Fiecare dintre aceste gene codifică un lanţ polipeptidic de 141 de aminoacizi. Cu toate acestea, secvenţele lor intronice sunt foarte divergente, chiar dacă intronii au aproximativ aceeaşi dimensiune. Reţineţi că o mare parte din secvenţa nucleotidică a fiecărei gene este conţinută în aceşti introni necodificatori.

Grupul de gene β -globinei umane conţine cinci gene distanţate de-a lungul a aproximativ 60 kb de ADN [Figura 21.18(b)]. În această subfamilie de gene, ca şi în subfamilia α-globinei, ordinea genelor pe cromozom corespunde ordinii lor de exprimare în timpul dezvoltării. Trei dintre cele cinci gene sunt exprimate înainte de naştere. Gena ε (epsilon) este exprimată numai în timpul embriogenezei, în timp ce cele două gene aproape identice (Gε şi Aε) sunt exprimate numai în timpul dezvoltării fetale . Produşii polipeptidici ai celor două gene diferă doar printr- un aminoacid . Cele două gene rămase, ε şi *ε,* sunt exprimate după naştere şi pe tot parcursul vieţii. Există o singură pseudogenă în această subfamilie. Cele cinci gene funcţionale din acest grup codifică proteine cu 146 de aminoacizi şi au doi introni de dimensiuni similare în exact aceleaşi poziţii. Al doilea intron din subfamilia α-globinei este semnificativ mai lung decât omologul său din subfamilia α-globinei funcţionale. Aceste caracteristici reflectă istoria evolutivă a fiecărei subfamilii şi evenimentele, cum ar fi duplicaţiile genelor, substituţiile nucleotidelor şi translocaţiile cromozomiale, care au generat actuala superfamilia de globine.

21,7

Metagenomica aplică tehnici genomice probelor prelevate din mediu

Metagenomica , numită şi genomică de mediu , este utilizarea tehnicilor de secvenţiere cu fragmente selectate aleatoriu pentru a secvenţia genomurile unor

comunități microbiene întregi în probe de mediu de apă, aer și sol. În prezent, oceanele, ghețarii, deșerturile și aproape orice alt mediu de pe Pământ sunt prelevate într-o serie de proiecte metagenomice. Pionierul genomului uman, J. Craig Venter, a părăsit Celera în 2003 pentru a forma Institutul J. Craig Venter, iar grupul său a jucat un rol central în dezvoltarea metagenomicii ca domeniu emergent al cercetării genomice.

Una dintre inițiativele majore ale institutului a fost o expediție globală pentru colectarea de probe de microorganisme marine și terestre din întreaga lume și secvențierea genomurilor acestora. În cadrul acestui proiect, numit Expedția Sorcerer II Global Ocean Sampling (GOS), Venter și cercetătorii săi au călătorit prin lume pe un iaht, într-o expediție care a fost descrisă ca un fel de versiune modernă a celebrei călătorii a lui Charles Darwin pe HMS Beagle.

Unul dintre principalele avantaje ale metagenomicii este că ne poate oferi mult mai multe informații despre milioane de specii bacteriene, dintre care doar câteva mii au fost bine caracterizate până în prezent. Multe virusuri noi, în principal bacteriofagi, au fost, de asemenea, identificate prin studii metagenomice ale probelor de apă . Metagenomica oferă informații noi și importante despre diversitatea genetică a microbilor; aceste informații sunt esențiale pentru înțelegerea interacțiunilor complexe dintre comunitățile microbiene și mediile lor, precum și pentru a permite clasificarea filogenetică a microbilor nou identificați. Metagenomica are, de asemenea, un mare potențial pentru identificarea genelor cu funcții noi, dintre care unele au aplicații potențial utile în medicină și biotehnologie.

Metoda generală utilizată în metagenomică pentru secvențierea genomurilor tuturor microbilor dintr-un anumit mediu implică izolarea ADN-ului direct dintr-o probă de mediu, fără a fi nevoie să se cultive microbii sau virusurile. Această tehnică este necesară deoarece este adesea dificil să se reproducă rețeaua complexă de condiții de creștere de care microbii au nevoie pentru a supraviețui în cultură. Pentru proiectul Sorcerer II GOS, probe de la diferite niveluri ale coloanei de apă au fost trecute prin filtre de înaltă densitate de diferite dimensiuni pentru a captura microbii . ADN-ul a fost apoi izolat de microbi și supus secvențierii prin fragmente selectate aleatoriu și asamblării genomului. Secvențiatoarele de mare randament de la bordul iahtului au funcționat practic non-stop. Una dintre primele expediții ale acestui grup a secvențiat genomurile bacteriene din Marea Sargaselor, lângă Bermuda. Acest proiect a produs peste 1,2 milioane de noi secvențe de ADN de la 1.800 de specii microbiene, inclusiv 148 de specii necunoscute anterior, și a identificat sute de gene fotoreceptoare. Multe microorganisme acvatice se bazează pe fotoreceptori pentru a capta energia luminoasă pentru fotosinteză . Oamenii de știință sunt interesați să afle mai multe despre fotoreceptori pentru a încerca să dezvolte modalități de utilizare a fotosintezei pentru a produce hidrogen drept combustibil. Cercetătorii medicali sunt, de asemenea, foarte interesați de fotoreceptori deoarece, la oameni și la multe alte specii, fotoreceptorii din retina ochiului sunt proteine cheie care detectează energia luminoasă și o transduc în semnale electrice pe care creierul le interpretează pentru a crea imagini vizuale .

La începutul anului 2007, baza de date GOS conținea aproximativ 6 miliarde de perechi de baze de ADN de la peste 400 de specii microbiene necaracterizate . Aceste secvențe includeau 7,7 milioane de secvențe care nu fuseseră caracterizate până în prezent și care codificau peste 6 milioane de proteine potențiale diferite . Acesta este aproape dublu față de numărul de proteine caracterizate anterior în toate celelalte baze de date cunoscute din lume (cum ar fi baza de date Swiss -Prot , despre care am discutat în exercițiul din secțiunea Explorare *Genomică*) . (din Capitolul 14). Figura 21.19(a) prezintă atribuirile regnurilor pentru secvențele proteice prezise în bazele de date disponibile public la nivel mondial , cum ar fi NCBI Non-Redundant Protein Database (NCBInr), care accesează GenBank, Ensembl și alte baze de date cunoscute . Secvențele eucariote constituie majoritatea (63 %) a proteinelor prezise în aceste baze de date . Însă analiza atribuirilor regnurilor a aproximativ șase milioane de proteine prezise în setul de date Global Ocean Sampling (GOS) arată , dimpotrivă , că marea majoritate (90,8 %) a secvențelor din această bază de date aparțin regnului bacteriilor [Figura 21.19 (b)] .

Expediția GOS a examinat, de asemenea, familii de proteine corespunzătoare proteinelor prezise codificate de secvențele genomice din baza de date GOS ; 17.067 de familii au fost de dimensiuni medii (între 20 și 200 de proteine) și mari (>200 de proteine). O diagramă Venn, cum ar fi cea prezentată în Figura 21.20, este o modalitate destul de comună de a reprezenta datele suprapuse obținute din bazele de date genomice. În această figură , ovalele suprapuse indică numărul de familii de proteine aparținând anumitor seturi de categorii . Fiecare zonă a diagramei este - etichetată cu numărul și procentul de familii, în raport cu cele 17.067 de grupuri GOS de dimensiuni medii și mari din fiecare categorie sau zonă de suprapunere. Dintre cele 17.067 de grupuri din baza de date

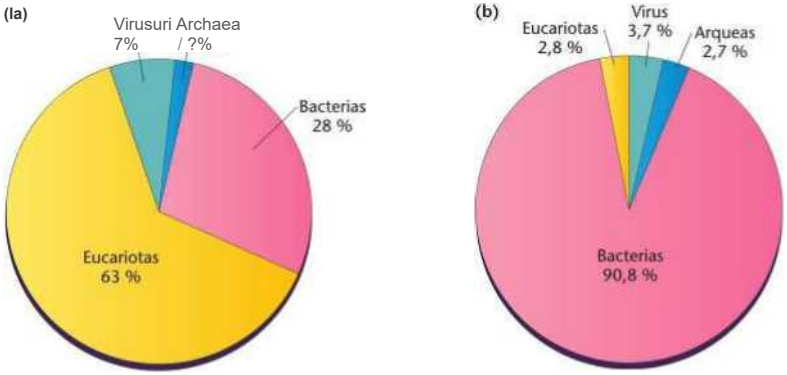


FIGURA 21.19 (a) Atribuirea regnurilor pentru proteinele prezise în bazele de date NCBInr, NCBI Prokaryotic Genomes, Institute for Genomics Research Gene Indices și Ensembl. Rețineți că bazele de date disponibile publicului cu genomuri secvențiate și proteinele prezise pe care le codifică aceste genomuri sunt dominate de secvențe eucariote. (b) Atribuirea regnurilor pentru proteinele noi prezise în baza de date Global Ocean Sampling (GOS). Secvențele bacteriene domină această bază de date, ilustrând valoarea metagenomicii pentru descoperirea de noi informații despre genomurile microbiene și comunitățile microbiene .

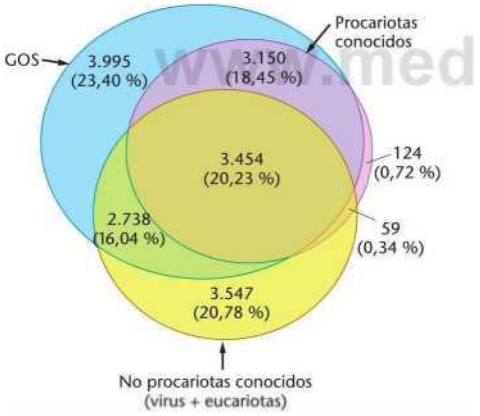


Figura 21.20 Diagrama Venn reprezentând cele 17.067 de grupuri de familii de proteine de dimensiuni medii și mari, clasificate în trei categorii: GOS, secvențe procariote cunoscute și secvențe non-procariote cunoscute. Rețineți că proiectul GOS a identificat 3.995 de grupuri de familii de gene de dimensiuni medii și mari, care sunt unice pentru baza de date GOS și nu prezintă omologii semnificative cu familiile de proteine cunoscute de la procariote și non-procariote (virusuri și eucariote).

GOS, 3995 nu a prezentat omologii semnificative cu familiile de proteine cunoscute din procariote, virusuri sau eucariote (Figura 21.20). Rezultatele rezumate în Figurile 21.19 și 21.20 ilustrează valoarea expediției GOS și a metagenomicii pentru identificarea de noi gene microbiene și proteine potențiale .

alte aplicații metagenomice avansate au apărut recent , inclusiv utilizarea metagenomicii pentru a identifica virusuri și fungi despre care se crede că sunt implicați în așa - numita tulburare de colaps al coloniilor, o boală care a cauzat pierderea a 50-90 % din populația de albine din stupii din Statele Unite.

21,8

Analiza transcriptomului dezvăluie profilurile genelor exprimate în celule și țesuturi

Secvențierea genomului este o sarcină formidabilă și, chiar și după secvențierea și adnotarea unui genom, rămâne o provocare colosală : înțelegerea funcției genomului prin analizarea genelor pe care le conține și a modului în care sunt reglate genele exprimate de genom. Analiza transcriptomului, cunoscută și sub denumirea de transcriptomică sau analiza expresiei genelor globale , studiază expresia genelor în cadrul unui genom atât calitativ - identificând genele care sunt exprimate și care nu - cât și cantitativ - măsurând

nivelurile variabile de expresie ale diferitelor gene.

După cum știm, toate celulele dintr-un organism posedă același genom, dar în orice tip de celulă sau țesut dat, nivelul de expresie al anumitor gene va fi ridicat, al altora va fi scăzut, iar unele nu vor fi exprimate deloc. Analiza transcriptomului oferă profiluri de expresie genică care, pentru un anumit genom, pot varia de la celulă la celulă sau de la un tip de țesut la altul. Identificarea genelor exprimate de un genom este esențială pentru înțelegerea modului în care funcționează acel genom. Analiza transcriptomului oferă date despre (1) modelele normale de expresie genică, care sunt importante pentru înțelegerea modului în care un tip de celulă sau țesut se diferențiază în timpul dezvoltării, (2) modul în care expresia genică dictează și controlează fiziologia celulelor diferențiate și (3) mecanismele de dezvoltare a bolilor care rezultă din sau sunt cauzate de modificări ale expresiei genice din celule . În Capitolul 22, vom vedea de ce analiza expresiei genice devine treptat un instrument de diagnostic important în anumite domenii ale medicinei. De exemplu, examinarea profilurilor de expresie genică într - o tumoare canceroasă poate ajuta la diagnosticarea tipului de tumoră, la determinarea probabilității metastazelor tumorale (răspândirii) și la dezvoltarea celei mai eficiente strategii de tratament.

Diverse tehnici pot fi utilizate pentru analiza transcriptomului. Metodele bazate pe PCR sunt utile deoarece pot detecta gene cu niveluri scăzute de expresie. Analiza cipurilor ADN este utilizată pe scară largă deoarece permite cercetătorilor să analizeze simultan toate genele exprimate într -o probă.

Majoritatea cipurilor ADN, numite și cipuri genetice, constau dintr-o lamă de sticlă, similară cu cele utilizate în microscoape, de care sunt atașate molecule de ADN monocatenar folosind un braț robotic de mare viteză, controlat de computer, numit arrayer . Arrayer-ele sunt echipate cu o serie de pini minusculi. Fiecare pintă este scufundată într-o cantitate mică de soluție care conține milioane de copii ale unei molecule de ADN monocatenar, molecula respectivă fiind diferită pentru fiecare pintă. De exemplu, multe cipuri ADN sunt realizate cu secvențe monocatenare de ADN complementar (ADNc) sau markeri de secvență exprimată (EST) - fragmente scurte de ADN clonate din gene exprimate. Arrayer-ul fixează ADN-ul pe lamă în poziții specifice (pete), care sunt înregistrate de un computer. Un singur cip ADN poate avea peste 20.000 de pete ADN distincte , fiecare conținând o secvență diferită dintr-o genă diferită. Sunt disponibile genomuri complete pe cipuri ADN, inclusiv genomul uman. După cum vom vedea în Capitolul 22, cercetătorii folosesc, de asemenea, cipuri ADN pentru a compara modelele de expresie genică în țesuturi ca răspuns la diferite condiții, pentru a compara modelele de expresie genică în țesuturile normale și bolnave și pentru a identifica agenții patogeni .

Pentru a pregăti un cip ADN pentru utilizare în analiza transcriptomului , oamenii de știință încep de obicei prin extragerea ARNm din celule sau țesuturi (Figura 21.21). ARNm este apoi de obicei transcris invers pentru a sintetiza ADNc marcat cu nucleotide fluorescente. ARNm sau ADNc pot fi marcate într- o varietate de moduri , dar majoritatea metodelor implică utilizarea de coloranți fluorescenți . De obicei, studiile pe cipuri ADN implică compararea expresiei genelor în diferite probe de celule sau țesuturi . ADNc preparat dintr -un țesut este de obicei marcat cu un colorant de o anumită culoare, de exemplu roșu , iar ADNc dintr -un alt țesut este marcat cu un colorant de o culoare diferită , cum ar fi verdele. ADNc-urile marcate sunt apoi denaturate și incubate peste noapte cu cipul ADN , astfel încât să hibridizeze la situsurile de pe cip care au secvențe de ADN complementare . Apoi, cipul ADN este spălat și apoi scanat cu un laser, ceea ce face ca ADNc hibridizat cu cip să emită lumină fluorescentă. Modelele de lumină fluorescentă - dezvăluie ce gene sunt exprimate în țesutul de interes, iar intensitatea fluorescenței fiecărui spot indică nivelul relativ de expresie . Cu cât punctul este mai luminos , cu atât ARNm-ul respectiv este exprimat mai mult în țesutul respectiv.

Cipurile ADN schimbă dramatic modul în care sunt analizate modelele de expresie genică. Așa cum s-a explicat în Capitolul 20, hibridizarea Northern blot a fost una dintre primele metode utilizate pentru analiza expresiei genice. Ulterior, tehnicile PCR s-au dovedit a fi mai rapide și mai sensibile. Principalul avantaj al cipurilor ADN este că permit studierea simultană a mii de gene . Drept urmare , însă , acestea pot genera o cantitate copleșitoare de date privind expresia genică . În plus , chiar și atunci când sunt controlate corespunzător , cipurile ADN oferă adesea rezultate variabile . De exemplu , un experiment în anumite condiții poate să nu producă întotdeauna modele de expresie genică similare cu cele ale unui alt experiment identic . Unele dintre aceste diferențe se pot datora diferențelor reale în expresia genică , dar altele pot rezulta din variabilitatea în prepararea cipului , sinteza ADNc , hibridizarea sondei sau condițiile de spălare - toate acestea trebuind controlate cu atenție pentru a limita o astfel de variabilitate . Cipurile ADN disponibile comercial pot reduce variabilitatea care apare atunci când fiecare cercetător individual își produce propriile cipuri.

Programele de analiză computerizată a datelor de pe cipurile ADN sunt esențiale pentru organizarea informațiilor privind profilurile de expresie genică obținute

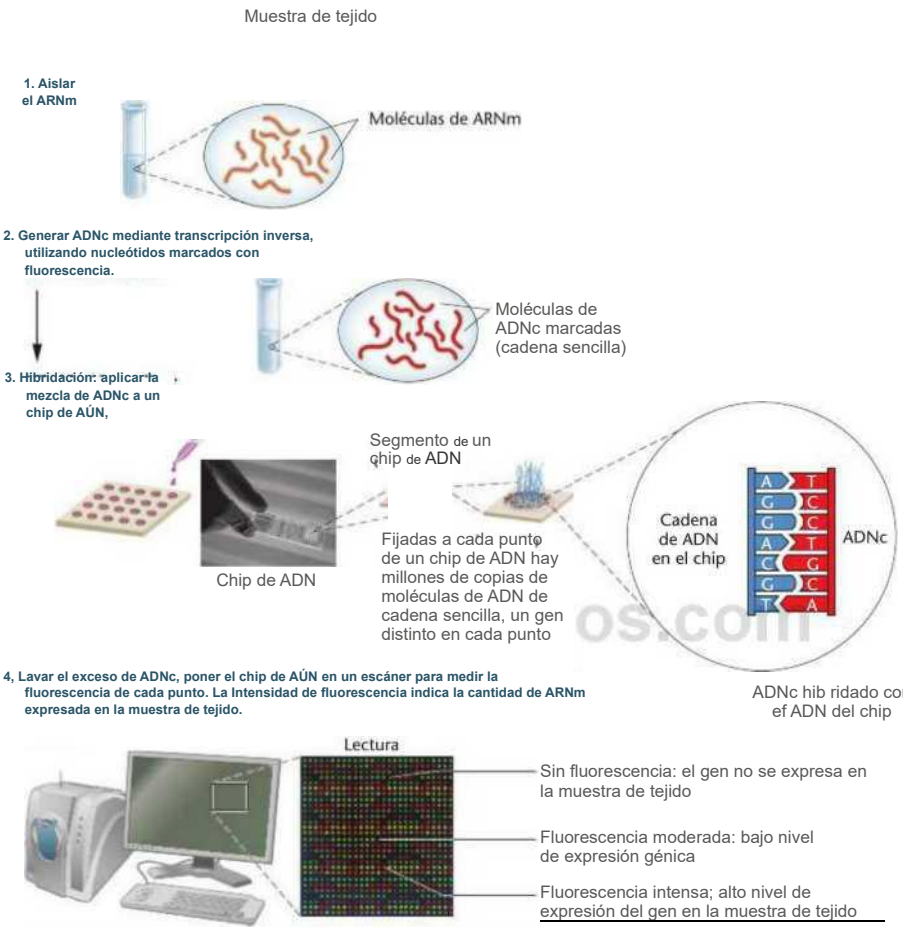

Muestra de tejido
1. Aislar el ARNm
Moléculas de ARNm
2. Generar ADNc mediante transcripción inversa, utilizando nucleótidos marcados con fluorescencia.
Moléculas de ADNc marcadas (cadena sencilla)
3. Hibridación: aplicar la mezcla de ADNc a un chip de AÚN,
Segmento de un chip de ADN
Chip de ADN
Fijadas a cada punto de un chip de ADN hay millones de copias de moléculas de ADN de cadena sencilla, un gen distinto en cada punto
Cadena de ADN en el chip
ADNc
4, Lavar el exceso de ADNc, poner el chip de AÚN en un escáner para medir la fluorescencia de cada punto. La Intensidad de fluorescencia indica la cantidad de ARNm expresada en la muestra de tejido.
ADNc hib ridado con ef ADN del chip
Lectura
Sin fluorescencia: el gen no se expresa en la muestra de tejido
Fluorescencia moderada: bajo nivel de expresión génica
Fluorescencia intensa; alto nivel de expresión del gen en la muestra de tejido

FIGURA 21.21 Análisis de los patrones de expresión genica en un tejido mediante chip de ADN.

.

Acest tip de tehnică poate fi utilizat, de exemplu, pentru a utiliza programe bazate pe algoritmi de clustering pentru a extrage date de intensitate din puncte situate în diferite poziții pe un cip ADN și pentru a grupa datele de expresie genică de la unul sau mai multe cipuri într-o serie de imagini de clustering care încorporează rezultatele mai multor experimente. Analiza clusterelor grupează genele în funcție de faptul că prezintă un nivel crescut sau redus de expresie în condițiile experimentale examinate. Figura 21.22(a) prezintă clustere ierarhice de modele de expresie genică crescută și redusă pentru drojdia *Saccharomyces cerevisiae* cultivată în diferite condiții experimentale. Rețineți că diferiți timpi de cultură dezvăluie modele diferite de niveluri reduse (oval galben) și crescute (oval alb) de expresie genică. Identitățile genelor din aceste clustere reglementate indică faptul că multe dintre genele afectate de condițiile de creștere din acest experiment sunt implicate în diviziunea celulară.

Figura 21.22(b) dezvăluie un profil interesant de expresie genică pentru genele Drosophila , în care acestea

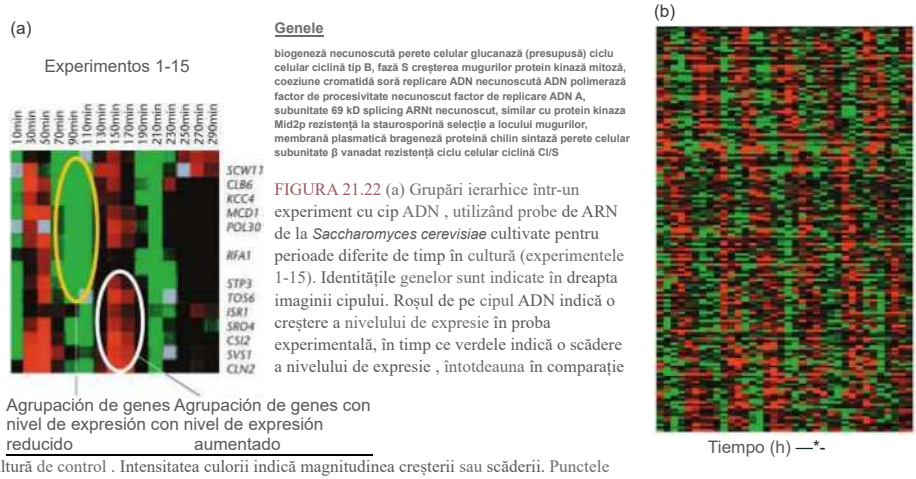


FIGURA 21.22 (a) Grupări ierarhice într-un experiment cu cip ADN , utilizând probe de ARN de la *Saccharomyces cerevisiae* cultivate pentru perioade diferite de timp în cultură (experimentele 1-15). Identitățile genelor sunt indicate în dreapta imaginii cipului. Roșul de pe cipul ADN indică o creștere a nivelului de expresie în proba experimentală, în timp ce verdele indică o scădere a nivelului de expresie , întotdeauna în comparație cu o cultură de control . Intensitatea culorii indică magnitudinea creșterii sau scăderii. Punctele mai luminoase reprezintă niveluri de expresie mai ridicate decât petele mai șterse sau negre. Ovalul galben marchează un grup de gene cu reglare redusă, în timp ce ovalul alb indică un grup de gene cu reglare crescută. (b) Niveluri ridicate (roșu), intermediare (negru) și scăzute (verde) de expresie genică pentru genele *Drosophila* care prezintă un ritm circadian. Probele de ARN Drosophila au fost colectate la fiecare patru ore timp de șase zile și apoi utilizate pentru analiza cipurilor ADN. Fiecare rând prezintă *cele* 36 de răspunsuri corespunzătoare unei singure gene. Fiecare coloană prezintă modelul de expresie genică corespunzător fiecărui moment de eșantionare. Genele sunt ordonate de sus în jos în funcție de timpul corespunzător activității lor maxime.

Acestea prezintă modele de expresie repetitive, ca parte a unui răspuns al ritmului circadian. Ritmurile circadiene sunt oscilații ale activității biologice care apar cu o perioadă regulată, cum ar fi 24 de ore. Reducerile activității electrice a undelor cerebrale care apar în timp ce dormim, urmate de creșterea activității care are loc pentru a ne trezi, chiar înainte ca ceasul deșteptător să sune dimineața, sunt exemple de răspunsuri circadiene. Pe cipul ADN al Drosophila , - fiecare rând orizontal prezintă rezultatele expresiei *pentru* o genă diferită . Observați cum , la fiecare câteva ore, nivelul de expresie al majorității genelor crește (roșu) și apoi scade (verde) câteva ore mai târziu , conform unui model ritmic care se repetă pe întreaga durată a acestui experiment (6 zile). Rezultate ca acestea sunt reprezentative pentru tipurile de profiluri de expresie genică pe care cipurile ADN le pot detecta . Vom vedea reprezentări similare ale datelor cipurilor ADN în Capitolul 24 .

În Secțiunea 21.6 , am discutat pe scurt genomul ariciului de mare și importanța acestui animal ca organism model fundamental . Aricii de mare au un plan corporal relativ simplu [Figura 21.23 (a)]. Aceștia conțin aproximativ 1.500 de celule, cu doar o duzină de tipuri celulare distincte. Cu toate acestea, dezvoltarea ariciului de mare progresează printr- o serie de modificări complexe în expresia genelor, care seamănă cu modelele de modificare a expresiei genelor în timpul dezvoltării vertebratelor. Acesta este unul dintre motivele pentru care aricii de mare sunt un organism model atât de valoros pentru studiile de biologie a dezvoltării.

Laboratorul de Cercetare Genomică Ames al NASA din Moffett, California, au folosit cipuri ADN pentru a efectua un studiu transcriptomic al expresiei genelor la arici de mare în primele două zile de dezvoltare (până la stadiul de gastrulă mijlociu-spre-târziu, la aproximativ 48 de ore după fertilizare). Această lucrare a arătat că aproximativ 52 % din toate genele ariciului de mare sunt active în această perioadă de dezvoltare: 11.500 din cele 23.500 de gene cunoscute ale ariciului de mare au fost exprimate în embrion.

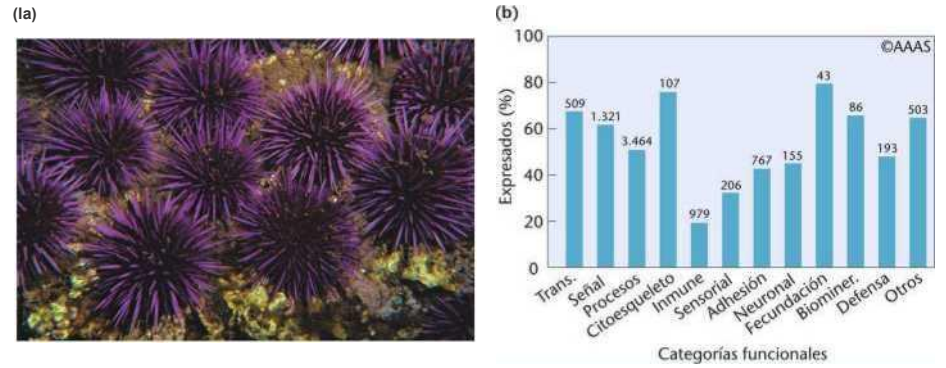


FIGURA 21.23 (a) Ariciul de mare *Strongylocentrotus purpuratus*. (b) Analiza transcriptomică a genelor exprimate în embrionul de arici de mare. Axa y a histogramei arată procentul de gene adnotate exprimate în embrion pentru diferite categorii funcționale. Numărul de deasupra fiecărei bare reprezintă numărul total de gene adnotate din categoria funcțională corespunzătoare. Trans.: factori de transcripție; Semnal: gene de semnalizare; Procese: procese celulare de bază, cum ar fi metabolismul; Citoschelet: gene citoscheletale; și Biominer.: biomineralizare.

Rolurile funcționale ale genelor exprimate în embrion au fost diverse , incluzând gene corespunzătoare la aproximativ 70% din cei aproape 300 de factori de transcripție prezenți în genomul ariciului de mare , alături de gene implicate în semnalizarea celulară, imunitate , fertilizare și metabolism [Figura 21.23(b)]. Incredibil, au fost exprimate și 51.000 de ARN-uri cu funcție necunoscută. Sunt în curs de desfășurare studii pentru a explica discrepanțele dintre numărul de gene și numărul de transcrieri exprimate, deși se știe deja că multe gene ale ariciului de mare sunt procesate extensiv prin mecanisme alternative de splicing . Analizele viitoare ale genomului ariciului de mare vor dezvălui, fără îndoială, aspecte interesante ale funcției genelor în timpul dezvoltării acestui animal și vor avansa înțelegerea noastră asupra geneticii dezvoltării embrionare atât la nevertebrate, cât și la vertebrate.

, că am discutat despre genomuri și transcriptomi, să ne îndreptăm atenția către produsele finale ale majorității genelor: proteinele codificate de un genom.

21,9

Proteomica identifică și analizează compoziția proteică a celulelor

Pe măsură ce tot mai multe genomuri au fost secvențiate și studiate, biologii din diverse discipline s-au concentrat din ce în ce mai mult pe încercarea de a înțelege structurile și funcțiile complexe ale proteinelor codificate de genomuri. Acest interes nu este surprinzător, deoarece în majoritatea genomurilor secvențiate până în prezent, multe gene nou descoperite și presupusele lor proteine nu au o funcție cunoscută. Rețineți pe parcursul explicațiilor - următoare că , deși fiecare celulă din organism conține un set echivalent de gene , nu toate celulele exprimă aceleași gene și proteine . Proteomul este un termen care reprezintă setul complet de proteine codificate de un genom , deși este adesea folosit și pentru a se referi la setul complet de proteine prezente într - o celulă. Prin urmare , această definiție ar include proteinele pe care o celulă le-a dobândit de la un alt tip de celulă.

Proteomica — identificarea completă, caracterizarea și analiza cantitativă a proteomului unei celule, țesut sau organism — poate fi utilizată pentru a reconcilia discrepanțele dintre numărul de gene dintr - un genom și numărul de proteine distincte produse. Dar, la fel de important , proteomica oferă și informații despre structura și funcția proteinelor ; modificări post-translaționale; interacțiuni proteină-proteină, proteină-acid nucleic și proteină-metabolit; localizarea proteinelor celulare; stabilitatea proteinelor ; aspecte translaționale și post-translaționale ale reglării expresiei genelor ; și relații (domenii comune , istoric evolutiv) cu alte proteine . Proiectele proteomice au fost utilizate pentru a caracteriza unele dintre principalele familii de proteine ale anumitor specii . De

exemplu , aproximativ două treimi din proteomul *Drosophila* a fost catalogat în mod adecvat folosind proteomica.

Proteomica prezintă, de asemenea, interes clinic, deoarece permite compararea proteinelor din țesuturile normale cu cele afectate de boli, ceea ce poate duce la identificarea proteinelor care pot acționa ca biomarkeri în anumite boli. Exemple ale acestui tip de aplicație includ analiza proteomică a proteinelor mitocondriale în timpul îmbătrânirii, cartografierea proteomică a plăcilor aterosclerotice din arterele coronare umane și profilarea proteinelor salivare ca mijloc de detectare și diagnosticare a bolilor.

Reconcilierea dintre numărul de gene și numărul de proteine exprimate de o celulă sau un țesut

Reamintim din Capitolul 14 ipoteza „o genă: o polipeptidă" a lui George Beadle și Edward Tatum. Așa cum am explicat în acel capitol și în alte părți, genomica a relevat că legătura dintre gene și produsele lor este adesea mult mai complexă . Genele pot avea - multiple situsuri de inițiere a transcrierii, producând astfel mai multe tipuri diferite de transcrieri. Splicing-ul alternativ și editarea moleculelor de pre-ARNm pot genera zeci de proteine diferite dintr-o singură genă. Reamintim estimările actuale conform cărora peste 50 % din genele umane produc mai mult de o proteină prin splicing alternativ . Drept urmare, proteomii sunt substanțial mai mari decât genomurile. De exemplu, cele 20.000 de gene ale genomului uman codifică 100.000 de proteine, deși unele estimări sugerează că proteomul uman poate conține până la 150.000-200.000 de proteine.

Proteomii suferă modificări dinamice care sunt parțial coordonate de reglarea modelelor de expresie genică - transcriptomul . Cu toate acestea , există un alt set de factori care afectează profilul proteomic al celulei, complicând și mai mult analiza funcției proteinelor . De exemplu, multe proteine sunt modificate prin evenimente co-translaționale sau post-translaționale, cum ar fi scindarea secvențelor de semnalizare care vizează o proteină către o cale organită , a propeptidelor sau a reziduurilor de inițiator de metionină ; prin atașarea la carbohidrați și lipide; sau prin adăugarea de grupări chimice prin metilare, acetilare, fosforilare și alte modificări. Sunt cunoscute peste o sută de mecanisme de modificare post -translațională . În plus, multe proteine funcționează prin interacțiuni elaborate proteină-proteină sau ca parte a unui complex molecular mare. Cu mult înainte ca o schiță a secvenței genomului uman să fie disponibilă, oamenii de știință discutau deja posibilitatea unui „Proiect Proteom Uman". Un motiv pentru care un astfel de proiect nu s -a materializat niciodată este că nu există un singur proteom : diferite țesuturi produc seturi diferite de proteine. Însă ideea pentru un astfel de proiect a condus la Inițiativa privind Structura Proteinelor (PSI) din cadrul Institutului Național de Științe Medicale Generale (NIGMS), o divizie a Institutului Național de Sănătate din SUA , care cuprinde peste o duzină de centre de cercetare . Lansat în anul 2000 , PSI este un proiect multifazic conceput pentru a analiza structurile tridimensionale a peste 4.000 de familii de proteine . Proteinele cu proprietăți terapeutice potențiale interesante reprezintă o prioritate maximă pentru PSI și , până în prezent, au fost determinate structurile a peste 1.000 de proteine . Printre principalele obiective se numără dezvoltarea de metode computaționale pentru prezicerea structurii proteinelor , determinarea structurilor proteice distinctive , diseminarea informațiilor din proiectul PSI și concentrarea asupra relevanței biologice a lucrării. Există, de asemenea, alte câteva proiecte în curs de desfășurare dedicate identificării profilurilor proteomice care sunt corelate cu boli precum cancerul și diabetul.

Tehnologii proteomice: electroforeză bidimensională în gel pentru separarea proteinelor

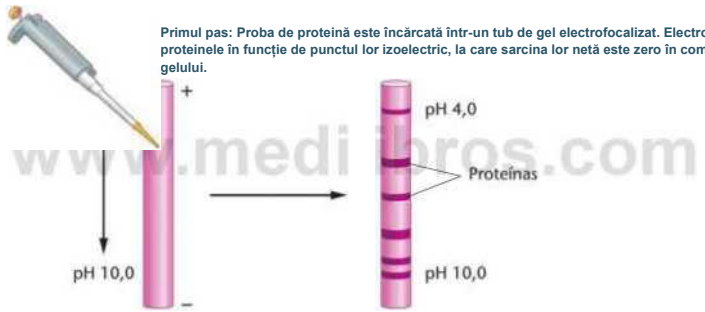
În Capitolul 20, am explicat cum, în primele zile ale clonării ADN -ului și ale tehnologiei ADN-ului recombinant , înainte de apariția genomicii , oamenii de știință clonau , secvențiau și studiau de obicei una sau câteva gene odată , pe parcursul mai multor ani . Până relativ recent , o abordare similară (deși folosind tehnici diferite) era în general utilizată pentru studierea proteinelor individuale sau pentru studiul simultan al unui număr relativ mic de proteine interconectate . Dar acum , datorită tehnologiilor proteomice , oamenii de știință au capacitatea de a studia simultan mii de proteine, generând rapid cantități uriașe de date și schimbând profund modul în care este analizat conținutul proteic al unei celule .

Istoria proteomicii datează din 1975 , odată cu dezvoltarea - electroforezei bidimensionale în gel (2DGE) ca tehnică de separare a sute sau mii de proteine cu rezoluție ridicată . În această tehnică, proteinele izolate din celulele sau țesuturile de interes sunt încărcate pe un gel de poliacrilamidă într-un tub și separate mai întâi prin - electrofocalizare, ceea ce face ca proteinele să migreze în funcție de sarcina lor electrică în cadrul unui gradient de pH . În timpul electrofocalizării , proteinele migrează până când ajung în poziția din gel unde sarcina lor netă este

zero în comparație cu pH-ul gelului (Figura 21.24). Apoi , într -o a doua migrare perpendiculară primei, proteinele sunt separate în funcție de masa lor moleculară folosind electroforeza în gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu (SDS-PAGE). În această etapă, tubul de gel este rotit cu 90° și plasat pe un gel SDS-PAGE; un curent electric este aplicat gelului pentru a separa proteinele în funcție de masa lor.

Proteinele din gelul 2D sunt vizualizate prin colorare cu albastru Coomassie, colorare cu argint sau alți coloranți care dezvăluie proteinele separate ca o serie de pete pe gel (Figura 21.25). Nu este neobișnuit ca un gel 2D încărcat cu un amestec complex de proteine să prezinte câteva mii de pete, așa cum se arată în Figura 21.25 , care ilustrează amestecul complex de proteine prezent în trombocitele umane (trombocite). Petele corespunzătoare - proteinelor care sunt deosebit de abundente în acest gel au fost etichetate cu numele proteinelor identificate . Dar cu mii de pete diferite pe gel , cum sunt determinate identitățile proteinelor ?

În unele cazuri , modelele din gelul 2D al probelor experimentale pot fi comparate cu geluri care conțin standarde de referință , cu proteine cunoscute ale căror modele de migrare sunt bine caracterizate. Sunt disponibile numeroase geluri de referință pentru diferite probe biologice , cum ar fi plasma umană , iar programele software pot fi utilizate pentru a alinia și compara punctele mai multor geluri. La începuturile tehnicii 2DGE , ...



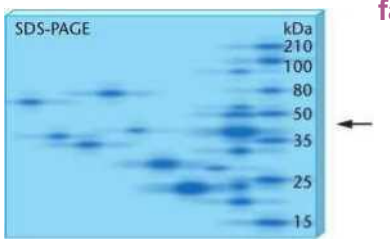
www.medi ibros.com

Primul pas: Proba de proteină este încărcată într-un tub de gel electrofocalizat. Electroforeza separă proteinele în funcție de punctul lor izoelectric, la care sarcina lor netă este zero în comparație cu pH-ul gelului.

A doua etapă: tubul de gel este rotit cu 90° și plasat pe un gel de poliacrilamidă SDS-PACE. Electroforeza separă proteinele în funcție de masa lor (greutatea moleculară în kilodaltoni, kDa).

Coloraţia cu gel prezintă proteinele ca o serie de pete separate în funcție de punctul lor izoelectric și masa moleculară.

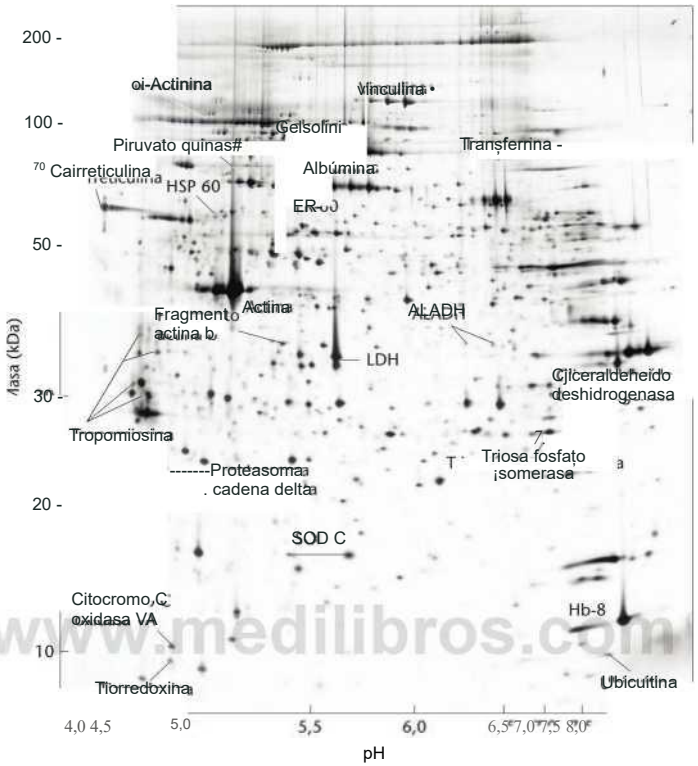
failli ii IDUUÍ -



Standarde de greutate moleculară a proteinelor

SDS-PAGE

FIGURA 21.24 Electroforeza bidimensională în gel (2DGE) este o metodă utilă pentru separarea proteinelor dintr-un extract proteic din celule sau țesuturi care conțin un amestec complex de proteine, cu proprietăți biochimice diferite.



www.medilibros.com

FIGURA 21.25 Separare bidimensională pe gel a proteinelor plachetare umane. Fiecare pată reprezintă un polipeptid distinct, iar diferitele polipeptide sunt separate prin greutatea lor moleculară (axa y) și în funcție de punctul lor izoelectric, pH-ul (axa x). Petele corespunzătoare proteinelor cunoscute sunt etichetate cu numele lor, pe baza identificării prin comparație cu un gel de referință sau prin determinarea secvenței proteinelor folosind tehnici spectrometrice. Rețineți că multe pete de pe gel sunt nemarcate, indicând prezența proteinelor cu identitate necunoscută.

Proteinele au fost adesea identificate prin secvențierea punctelor dintr- un gel și secvențierea aminoacizilor conținuți în aceste puncte. Această metodă generează de obicei doar secvențe relativ mici de aminoacizi; rareori este posibilă secvențierea unui polipeptid întreg folosind această tehnică. BLAST și programe similare pot fi utilizate pentru a căuta în bazele de date de proteine care conțin secvențe de aminoacizi ale proteinelor cunoscute . Cu toate acestea, din cauza mecanismelor alternative de splicing sau a modificărilor post-translaționale , secvențele peptidice nu pot fi întotdeauna ușor potrivite cu produsul final și poate fi necesar să se confirme identitatea proteinei folosind o altă abordare. După cum vom vedea în secțiunea următoare, proteomica a încorporat alte tehnici pentru a ajuta la identificarea proteinelor , iar o astfel de tehnică este spectrometria de masă .

Tehnologii proteomice: spectrometrie de masă pentru identificarea proteinelor

Deși tehnologia 2DGE a fost foarte importantă pentru analiza proteinelor , spectrometria de masă (MS) s-a dovedit fundamentală pentru dezvoltarea proteomicii . Tehnicile de spectrometrie de masă analizează probele ionizate în formă gazoasă și măsoară raportul masă-sarcină (m/z) al diferiților ioni dintr-o probă.

Proteinele analizate prin spectrometrie de masă generează spectre m/z care pot fi corelate cu o bază de date m/z care conține secvențe proteice cunoscute pentru a determina identitatea proteinei. Anumite aplicații MS pot furniza secvențe peptidice direct din spectre. Unele dintre cele mai utile aplicații proteomice ale acestei tehnologii includ identificarea uneia sau mai multor proteine necunoscute într-un amestec complex de proteine, secvențierea peptidelor, identificarea modificărilor post-translaționale ale proteinelor și caracterizarea complexelor multiproteice.

O tehnică de spectrometrie de masă utilizată în mod obișnuit este desorbția/ionizarea cu laser asistată de matrice (MALDI). Tehnologia MALDI este ideală pentru identificarea proteinelor și este utilizată pe scară largă în analiza probelor de țesut tratate în diferite condiții. Mai întâi , proteinele sunt extrase din celulele sau țesuturile de interes și separate folosind 2DGE. Apoi, tehnologia MALDI (descrisă mai târziu) este utilizată pentru a identifica proteinele prezente în diferite puncte ale gelului. Figura 21.26 prezintă un exemplu în care două seturi diferite de celule cultivate sunt analizate pentru diferențe în proteinele lor. Aproape orice sursă care furnizează un număr suficient de celule poate fi utilizată: sânge, țesuturi

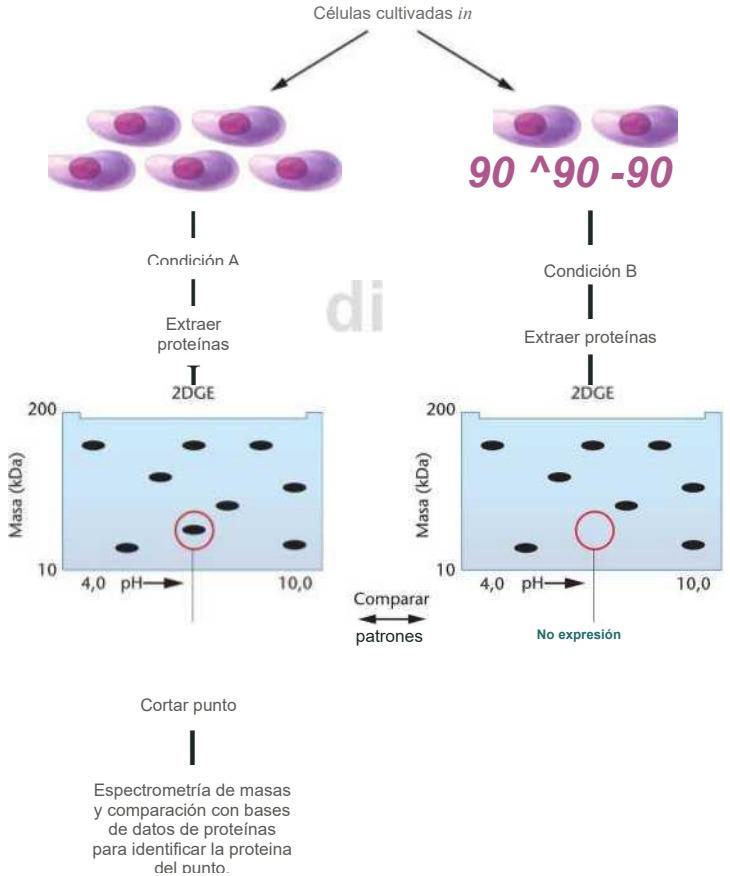


FIGURA 21.26 En un análisis proteómico típico, las células se exponen a diferentes condiciones (como por ejemplo distintas condiciones de crecimiento, fármacos u hormonas). Después, se extraen las proteínas de esas células y se separan mediante 2DGE, y los patrones de puntos resultantes se comparan en busca de evidencias de expresión diferencial de las proteínas. Los puntos de interés se cortan del gel, se digieren para obtener fragmentos peptídicos y se analizan mediante espectrometría de masas para identificar la proteina que contienen.

și organe întregi , probe tumorale , microbi și multe alte substanțe. Multe proteine implicate în cancer au fost identificate folosind MALDI pentru a compara profilurile proteice ale țesuturilor normale și ale probelor tumorale .

Situsurile de clivaj ale proteinelor sunt extrase din gena 2D, iar proteinele sunt apoi purificate. Sunt disponibile instrumente computerizate de mare randament care pot extrage toate situsurile dintr-un gel 2D . Proteinele izolate sunt apoi digerate enzimatic cu o protează (o enzimă care digeră proteinele), cum ar fi tripsina, pentru a crea o serie de peptide. Această proteoliză produce un amestec complex de peptide determinat de situsurile de clivaj ale proteazălor de pe proteina originală . Fiecare tip de proteină produce un set caracteristic de fragmente de peptide, care sunt identificate folosind MALDI după cum urmează.

În MALDI, peptidele sunt amestecate cu o matrice de material acid cu greutate moleculară mică, absorbant al ultravioletelor (UV) , cum ar fi acidul dihidroxibenzoic, și aplicate pe o placă metalică. Proba este apoi iluminată cu un fascicul laser UV, utilizând un laser cu azot cu o lungime de undă de 337 nm. Pe măsură ce matricea absorbe energia de la laser, căldura care se acumulează în matrice vaporizează și ionizează fragmentele de peptide. Ionii eliberați sunt apoi analizați pentru a le determina masa; MALDI afișează raportul m/z al fiecărei peptide ionizate ca o serie de vârfuri reprezentative pentru masele moleculare ale peptidelor prezente în amestec, împreună cu abundența lor relativă (Figura 21.27). Deoarece diferite proteine produc seturi diferite de fragmente de peptide, MALDI oferă o „amprentă" peptidică caracteristică proteinei analizate.

Bazele de date cu spectre m/z generate de MALDI pentru diferite peptide pot fi analizate pentru a găsi potriviri între spectrele m/z ale probelor necunoscute și cele ale proteinelor cunoscute. O limitare a acestei tehnici este calitatea bazelor de date în sine . O proteină necunoscută într-un gel 2D poate fi identificată cu MALDI numai dacă bazele de date proteomice au un spectru MALDI pentru proteina respectivă. Cu toate acestea, la fel ca în cazul bazelor de date genomice, bazele de date proteomice cu mii de proteine bine caracterizate de la diferite organisme sunt dezvoltate rapid .

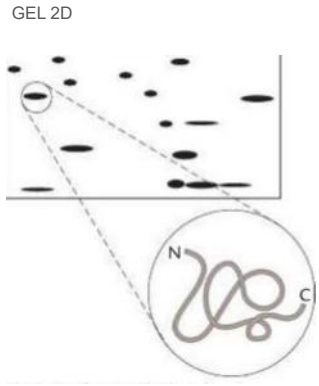
tehnică de analiză biochimică a masei proteice numită timp de zbor (TOF *).* Timpul de zbor (TOF) deplasează fragmentele de peptide ionizate printr-un câmp electric în vid. Fiecare ion are o viteză care variază în funcție de masa sa. Viteza cu care fiecare ion traversează camera de vid poate fi măsurată , iar diferențele dintre energiile cinetice ale ionilor pot fi utilizate pentru a dezvolta un profil de viteză dependent de masă - un spectru MALDI -TOF - care arată „timpul de zbor" al fiecărui ion. Spectrele MALDI-TOF pot fi apoi comparate cu bazele de date cu spectre de proteine cunoscute, așa cum s-a descris anterior pentru spectrele MALDI .

Există multe alte metode care utilizează spectrometria de masă. Unele utilizează cromatografia de lichide (LC) pentru a separa proteinele în funcție de masa lor și apoi utilizează tehnici de spectrometrie de masă în tandem (MS/MS) pentru a genera spectrele m/z. De asemenea, încep să apară noi tehnici de spectrometrie de masă care nu necesită geluri. Așa cum s-a menționat în discuția despre genomică, instrumentele 2DGE de mare randament și spectrometrele de masă pot procesa mii de probe într-o singură zi. Instrumente cu timpi de procesare a probelor mai rapizi și o sensibilitate mai mare sunt în prezent în curs de dezvoltare . Aceste instrumente ar putea face în curând din „proteomica fragmentelor selectate aleatoriu" o tehnică viabilă pentru caracterizarea proteomilor întregi .

Cipurile proteice devin, de asemenea, instrumente din ce în ce mai utile pentru cercetarea proteomică. Aceste cipuri sunt proiectate folosind același concept de bază ca și cipurile ADN și sunt adesea construite cu anticorpi care recunosc și se leagă în mod specific de diferite proteine. Printre alte aplicații, aceste cipuri sunt utilizate pentru a examina interacțiunile proteină-proteină, pentru a detecta markeri proteici pentru diagnosticarea bolilor și pentru a studia biosenzori concepuți pentru a detecta microbi patogeni și arme biologice potențial infecțioase.

Identificarea colagenului în fosilele de *Tyrannosaurus rex* și *Mammut americanum*

Recent, o echipă de oameni de știință a publicat rezultatele analizei prin spectrometrie de masă a țesutului osos dintr-un schelet de *Tyrannosaurus rex* descoperit în Formațiunea Hell Creek din Montana, SUA , estimat la 68 de milioane de ani. După cum s-a menționat anterior, ADN-ul a fost recuperat din fosile, dar presupunerea generală este că proteinele se degradează în materialele fosilizate și nu pot fi recuperate. Acest studiu a demonstrat că fosilizarea nu distruge complet toate proteinele din fosilele care au fost bine conservate în anumite condiții .



O proteină necunoscută, tăiată dintr-un punct dintr-un gel 2D, este mai întâi digerată în mici fragmente de peptide folosind o protează precum tripsina.

Fragmentele peptidice sunt supuse spectrului m / z al proteinei necunoscute .

Spectrometrie de masă pentru obținerea unei Cunoscuta ramură de masă snertrn /rr,M . o P 9 baze de date P- rateomice a spectrelor m/z ale peptidelor potrivire a spectrelor ar permite " identifică secvența peptidică a proteinei necunoscute.

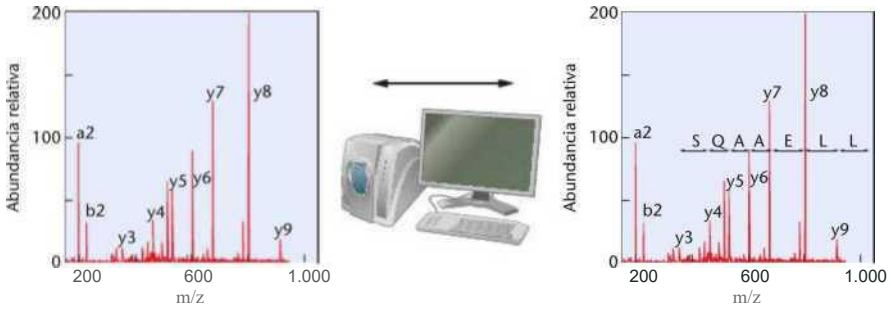


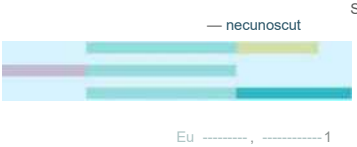
FIGURA 21.27 Spectrometrie de masă pentru identificarea unei proteine necunoscute izolate dintr-un gel 2D. Spectrul masă-sarcină (m/z) - determinat, de exemplu, prin MALDI - al peptidelor digerate cu tripsină corespunzătoare proteinei necunoscute poate fi comparat cu o bază de date proteomică pentru a găsi un spectru potrivit și astfel a identifica proteina necunoscută. S-a constatat că peptida din acest exemplu are secvența de aminoacizi serină (S)-glutamină (Q)-alanină (A)-alanină (A)-acid glutamic (E)-leucină (L)-leucină (L), reprezentată cu codul aminoacizilor dintr-o singură literă .

condiții. Această cercetare ilustrează, de asemenea, puterea și sensibilitatea spectrometriei de masă ca instrument proteomic.

În acest studiu, țesutul de măduvă osoasă a fost extras din interiorul oaselor femurale stâng și drept. Țesutul de măduvă osoasă este un os poros, spongios, care conține celule ale măduvei osoase, vase de sânge și nervi. *Proteinele T.* rex Extrase din țesut au prezentat reactivitate încrucișată cu anticorpii anti-colagen de la pui și au fost digerate de protează colagenază specifică colagenului . Aceste rezultate sugerează că probele de proteine *T. rex* conțineau colagen, unul dintre principalii

ACUM REZOLVĂ ASTA

21.3 Sarcina adnotării proteomului este de a relaționa fiecare proteină cu o funcție specifică în timp și spațiu. În mod tradițional, adnotarea proteinelor se baza pe compararea secvențelor de aminoacizi ale unei proteine necunoscute cu una cu funcție cunoscută. Dacă cele două proteine aveau o porțiune semnificativă în comun a secvenței lor , se presupunea că proteina necunoscută avea aceeași funcție ca proteina adnotată. O reprezentare a acestei metode de adnotare a proteinelor este prezentată mai jos, utilizând o secvență necunoscută și trei proteine umane diferite . Rețineți că secvența necunoscută se aliniază cu domeniile comune ale celorlalte trei proteine. Ce argument ați putea aduce pentru a sugera că funcția proteinei necunoscute este legată de cea a celorlalte trei proteine?



Regiunea secvenței de aminoacizi care corespunde necunoscutului

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să ne gândim la similaritățile de secvență dintre cele patru proteine și să anticipăm relațiile lor funcționale. Cheia rezolvării este să ne amintim că, deși domeniile proteice pot avea funcții corelate , proteinele pot conține mai multe domenii diferite care interacționează între ele pentru a determina funcția proteinei.*

componente structurale ale oaselor, ligamentelor, tendoanelor și pielii. Pentru a identifica definitiv prezența colagenului, peptidele triptice din probele de T. *rex* au fost analizate prin cromatografie lichidă - spectrometrie de masă (LC/MS; Figura 21.27). Spectrele m /z ale uneia dintre peptidele T. rex au fost identificate ca fiind corespunzătoare colagenului dintr - o bază de date cu spectre m / *z* . Comparați spectrul unei peptide de colagen din *Figura* 21.28(a) cu cel al unei versiuni sintetice a unei peptide de colagen [Figura 21.28(b)] și veți observa că raporturile m/z ale tuturor ionilor - principali se aliniază aproape identic, confirmând că secvența T. *rex Este* vorba de colagen. Peptida T. rex conținea, de asemenea, o grupare hidroxil atașată *la* un reziduu de prolină. Hidroxilarea

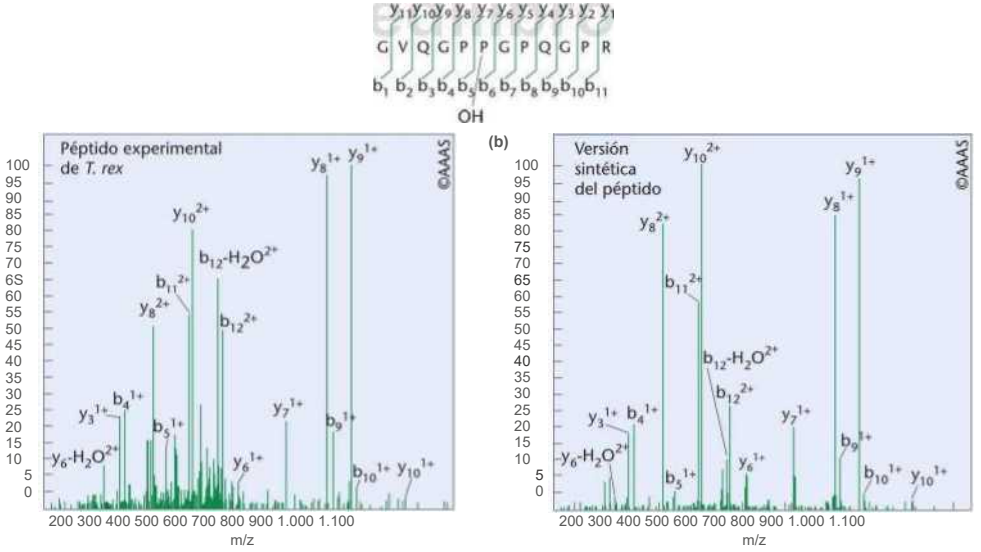


FIGURA 21.28 (a) Patrones de espectrometría de masas (MS) para una secuencia peptídica digerida con tripsina —GVQPP(OH) GPQGPR— de *T rex*. La secuencia peptídica mostrada aquí con el código de aminoácidos de una sola letra contiene un grupo hidroxilo cargado característico del colágeno, (b) Espectrometría de masas de una versión sintética de un péptido de colágeno, que muestra una buena alineación con los espectros m/z de iones fragmentados del péptido de *T. rex*, lo que confirma que la secuencia de *T rex* es colágeno e ilustra la utilidad de las técnicas MS.

prolinei este o caracteristică definitorie a colagenului. În plus, secvența de aminoacizi a peptidei de colagen *T. rex* s-a aliniat cu o izoformă de colagen de pui, demonstrând similaritatea secvenței. Această lucrare a furnizat dovezi experimentale excelente care susțin teoria larg acceptată conform căreia păsările și dinozaurii sunt strâns înrudiți.

Rezultate similare au fost obținute pentru peptide de la un mastodon antic *(Mammut americanum) vechi* de 160.000 și 600.000 de ani, care au prezentat corespondențe cu colagenul de la speciile actuale, inclusiv izoforme de colagen de la oameni, cimpanzei, câini, vaci, găini, elefanți și șoareci.

ACUM REZOLVĂ ASTA

21.4 Datorită accesibilității și importanței sale biologice , proteomul plasmatic uman a fost studiat intens și utilizat pentru a furniza biomarkeri pentru boli precum infarctul miocardic acut (troponină) și insuficiența cardiacă (peptidă natriuretică de tip B). Polanski și Anderson (Polanski, M. și Anderson, N. L., *Biomarker Insights,* (2:1-48, 2006) au întocmit o listă de 1.261 de proteine, dintre care unele se găsesc în plasmă , care par a fi exprimate diferențiat în cancerele umane . Dintre aceste 1.261 de proteine, doar 9 au fost recunoscute de FDA din SUA ca proteine asociate tumorii. În primul rând, ce avantaj ar oferi utilizarea plasmei ca instrument de diagnostic pentru cancer? În al doilea rând, ce criterii ar trebui utilizate pentru a valida faptul că o stare canceroasă poate fi determinată folosind proteomul plasmatic ?

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să luăm în considerare criteriile utile pentru utilizarea proteomicii plasmatice ca instrument de diagnostic pentru cancer. Cheia rezolvării acesteia este să ne gândim la datele proteomice pe care dorim să le evaluăm pentru a determina dacă o anumită proteină este legată de cancer.*

21.10

Biologia sistemelor este o abordare integrată a studiului interacțiunilor dintre toate componentele celulare ale unui organism

Încheiem acest capitol prin a discuta biologia sistemelor , o disciplină emergentă care încorporează date din genomică , transcriptomică, proteomică și alte domenii ale biologiei, precum și aplicații inginerești și tehnici de rezolvare a problemelor. Identificarea genelor și proteinelor prin analiza mutațională a genomurilor a fost o metodă foarte importantă și eficientă pentru caracterizarea genelor atunci când mutanții care prezintă fenotipuri vizibile fac parte din căi biochimice similare. Cu toate acestea, nici măcar analiza mutațională exhaustivă nu poate explica pe deplin anumite procese celulare complexe, cum ar fi căile de transducție a semnalului, căile metabolice și reglarea diviziunii celulare, a replicării ADN-ului și a expresiei genelor. Este necesară o abordare mai cuprinzătoare și integrată.

Așa cum am menționat anterior în acest capitol , până relativ recent, o mare parte din ceea ce am învățat despre funcțiile genelor și proteinelor la nivel celular , molecular și biochimic a fost descoperit în principal prin decenii de muncă a oamenilor de știință care studiau funcțiile genelor individuale sau ale unui număr relativ mic de gene și proteine. Mulți cercetători și-au dedicat întreaga carieră unei singure proteine sau gene. Cu toate acestea , exact când se pare că știm tot ce este de știut chiar și despre cea mai bine caracterizată proteină, un alt studiu dezvăluie brusc că această proteină are funcții noi. Aceste tipuri de relații demonstrează cât de incompletă este înțelegerea noastră asupra complexității extreme a genelor și proteinelor unei celule. Pentru a folosi o analogie simplă, am putea studia componentele individuale ale telefonului nostru mobil, dar până când nu ne-am concentra asupra modului în care interacționează aceste componente multiple, nu am putea înțelege cum funcționează de fapt telefonul .

Este esențial să se coreleze studiile genomice cu funcția genelor și fiziologia diferitelor stadii ale bolii. De exemplu, studiile de asociere la nivelul întregului genom au relevat numeroase loci asociate cu bolile, dar aceste informații trebuie încă traduse pentru a face predicții diagnostice utile și fiabile și pentru a dezvolta ținte farmacologice pentru proteinele cheie implicate în boli. Una dintre principalele provocări din biologia modernă este înțelegerea interacțiunilor dintre gene și proteine care permit procese complexe , cum ar fi diviziunea celulară; acesta este subiectul biologiei sistemelor. Proteinele funcționează ocazional independent , dar mai des lucrează în rețele complexe, interconectate , reglate și controlate de alte proteine sau metaboliți . Aceste rețele proteice interactive formează cadrul de reglementare care controlează modul în care celulele răspund la semnalele de mediu, metabolizează nutrienții, mișcă organitele , se divid și desfășoară multe alte procese. Pe măsură ce

genomica și proteomica au avansat, biologia sistemelor a apărut ca o abordare mai holistică a studierii funcției celulare prin analizarea interacțiunilor dintre toate componentele moleculare ale unui sistem biologic. Biologia sistemelor ia în considerare genele, proteinele, metaboliții și alte molecule dintr-o celulă și modul în care acestea interacționează pentru a înțelege aceste interacțiuni moleculare și a integra aceste informații în modele care pot fi utilizate pentru a înțelege mai bine funcțiile biologice ale unui organism .

În multe privințe, biologia sistemelor interpretează informațiile genomice în contextul structurii, funcției și reglării căilor biologice. După cum știm, sistemele biologice sunt foarte complexe; prin studierea relațiilor dintre componentele unui organism, biologii încearcă să construiască un model la nivel de „sistem" care reflectă modul în care funcționează organismele. De obicei, biologii sistemelor combină datele genomice și proteomice nou dobândite cu ani de cercetare mai tradițională asupra structurii și funcției genelor și proteinelor.

O mare parte din aceste date sunt extrase din baze de date precum PubMed, GenBank și alte resurse recente despre genomică, transcriptomică și proteomică. Modelele de sisteme sunt utilizate pentru a construi diagrame ale interacțiunilor dintr-o celulă sau dintr-un organism întreg, cum ar fi interacțiunile proteină-proteină, interacțiunile proteină-acid nucleic și interacțiunile proteină-metabolit (de exemplu, legarea enzimă-substrat). Aceste modele îi ajută pe biologii de sisteme să înțeleagă componentele care interacționează ale căilor metabolice, precum și interrelațiile dintre moleculele din cadrul acestor căi. În ultimii ani, termenul de interactom a ajuns să fie folosit pentru a descrie componentele care interacționează dintr-o celulă. Biologii de sisteme folosesc diferite tipuri de modele pentru a construi diagrame ale căilor de interacțiune ale proteinelor. Unul dintre cele mai comune tipuri de modele este o hartă de rețea - o diagramă care arată proteinele, genele și alte molecule care interacționează. Aceste diagrame sunt în esență echivalentul schemelor de cablare electrică. Unul dintre dezavantajele hărților de rețea este că sunt diagrame statice, care de obicei nu oferă informații despre momentul și locul în care are loc fiecare interacțiune. Chiar și așa, ele reprezintă o bază foarte utilă pentru generarea de modele computerizate care permit rularea de simulări pentru a determina cum au loc evenimentele de semnalizare. De exemplu, au fost create hărți de rețea ale principalelor grupuri de kinaze , enzime care fosforilează alte proteine pentru a le influența activitatea, pentru a arăta interacțiunile lor reciproce. Întrucât kinazele joacă un rol atât de important în reglarea majorității proceselor celulare critice , aceste informații despre „ kinom " s -au dovedit foarte utile pentru companiile care dezvoltă tratamente medicamentoase care vizează căi metabolice specifice .

Hărțile de rețea îi ajută pe oamenii de știință să modeleze interacțiunile potențiale complexe dintre moleculele implicate în procesele normale și cele specifice unei boli . Figura 21.29 prezintă un exemplu de hărtă de rețea . Această hartă prezintă un model de rețea al bolilor umane , ilustrând complexitatea interacțiunilor dintre genele implicate în 22 de boli umane diferite. Observați grupul de noduri turcoaz , care corespunde genelor implicate în mai multe tipuri de cancer diferite . Un aspect al hărții care ar trebui să fie imediat evident este faptul că o serie de tipuri de cancer au în comun mai multe gene interconectate, chiar și atunci când aceste tipuri de cancer afectează organe diferite . Cunoașterea genelor implicate și a rețelelor de interacțiune a proteinelor pentru diferite tipuri de cancer reprezintă un progres remarcabil în informarea oamenilor de știință cu privire la genele și proteinele țintă care trebuie luate în considerare în scopuri terapeutice .

Biologia sistemelor devine din ce în ce mai importantă în - procesul de descoperire și dezvoltare a medicamentelor , tehnicile sale putând ajuta oamenii de știință și clinicienii să dezvolte un cadru conceptual al interacțiunilor dintre gene și proteine în bolile umane , care poate servi apoi drept bază pentru proiectarea de medicamente eficiente . Înțelegerea progresiei și dezvoltării bolilor prin definirea rețelelor de interacțiune ale moleculelor în țesuturile normale și bolnave va fi crucială pentru detectarea și tratarea bolilor complexe , cum ar fi cancerul . În prezent, se dezvoltă numeroase baze de date pentru a modela interactomii bolilor umane , inclusiv cancerul de sân și de prostată , diabetul și astmul , precum și bolile cardiovasculare . Biologia sistemelor este , de asemenea, utilizată pentru a crea biocombustibili și pentru a proiecta organisme modificate genetic care pot fi utilizate pentru curățarea mediului , ca să numim doar câteva exemple de aplicații interesante care apar .

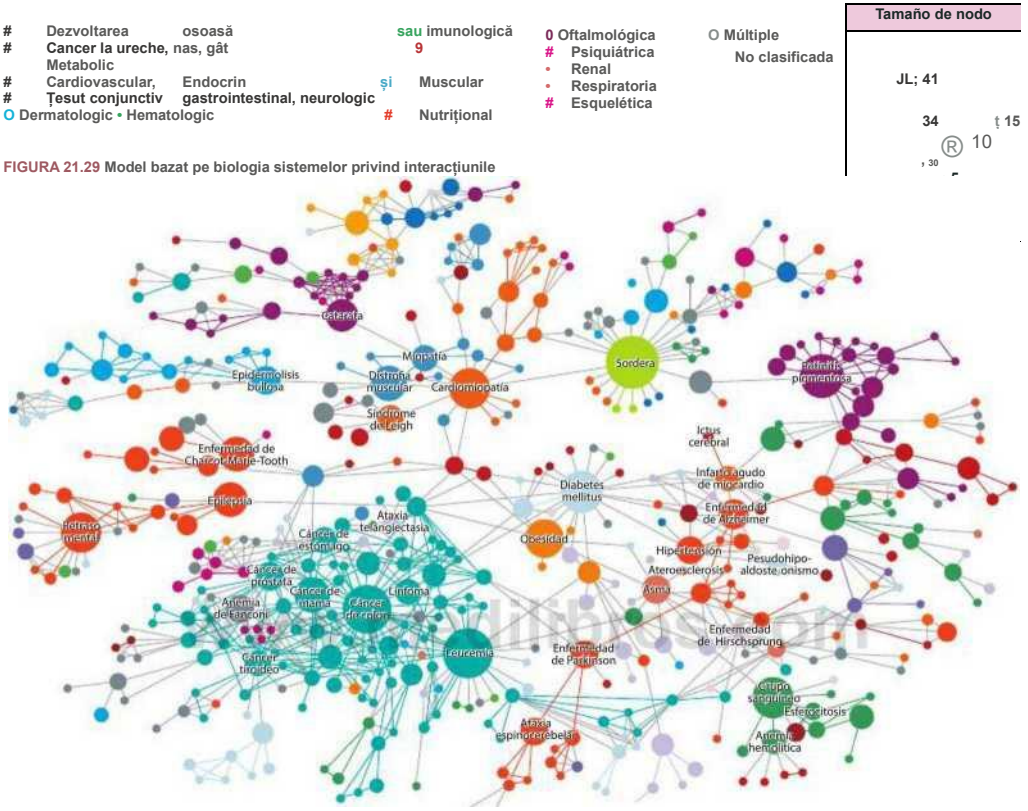


FIGURA 21.29 Model bazat pe biologia sistemelor privind interacțiunile

© 2007 Macmillan Publishers Ltd.

genelor în bolile umane. Modelul prezintă noduri corespunzătoare a 22 de boli specifice, colorate în funcție de clasa lor. Dimensiunea fiecărui nod este proporțională cu numărul de gene care contribuie la boală.

STUDIU DE CAZ | Bioprospectarea pe urmele lui Darwin

Expediția Global Ocean Sampling (GOS) a urmat traseul călătoriei lui Charles Darwin pentru a cataloga diversitatea genetică a microbilor din mediul marin. Metagenomica a fost utilizată pentru a cataloga secvențele de ADN și proteinele pe care aceste secvențe le codifică pentru mii de organisme nedescrise anterior, prezente în probele colectate din diverse regiuni oceanice . Deși multe probe rămân de analizat , proiectul a identificat deja peste 1,2 milioane de gene noi și mii de specii necunoscute anterior oamenilor de știință. De asemenea, a generat date despre peste 1.700 de familii de proteine necunoscute anterior și a compilat informații despre peste șase milioane de proteine specifice. Unele, cum ar fi cele care formează pompe de protoni alimentate de lumină și cele implicate în procesele de fixare a hidrogenului, ar putea avea aplicații imediate în tehnologie și agricultură . Deocamdată, însă , accentul se pune pe obținerea unei mai bune înțelegeri a distribuției și diversității microbilor în oceane. Acest proiect la scară largă a ridicat mai multe întrebări despre bioprospectarea în apele naționilor de coastă .

1. Deși locurile de prelevare a probelor sunt selectate în consultare cu oamenii de știință din țările relevante , cui aparțin organismele colectate pe coastele acelor țări?
2. Cine va deține procesele sau produsele dezvoltate din aceste resurse genetice?
3. Cum ar putea fi aplicate rezultatele acestui studiu metagenomic?
4. Ești surprins că atât de multe organisme nedescoperite anterior sunt reprezentate în probele colectate de această expediție ?

EXPLORARE DE GENOMICĂ

Contigos, secvențiere prin fragmente selectate aleatoriu și genomică comparativă

. Domeniu de studiu: Explorare genomică

ȘI În acest capitol, am văzut cum metodele de secvențiere aleatorie a fragmentelor pot fi utilizate pentru a asambla hărți cromozomiale ale unor genomuri întregi . Reamintim că, în clonarea fragmentelor aleatorii , ADN -ul cromozomial este mai întâi digerat cu diferite enzime de restricție pentru a crea o serie de fragmente de ADN suprapuse numite secvențe contigue sau „contige ". Contigele sunt apoi supuse secvențierii ADN, după care se utilizează - programe bazate pe bioinformatică pentru a aranja contigele în ordinea corectă , pe baza suprapunerii dintre secvențele scurte de nucleotide .

În acest exercițiu de *explorare genomică* , vom efectua o simulare de aliniere contiguă pentru a înțelege mai bine logica din spatele acestei tehnici de creare a hărților secvențiale cromozomiale . Pentru a face acest lucru, vom reveni la site-ul **BLAST** al *Centrului Național pentru Informații Biotehnologice* . pe care l -am folosit deja în *exercițiile de Explorare Genomică* și vom aplica acolo un program de aliniere a ADN-ului numit bl2seq .

■ Exercițiul I. Ordonarea comtigelor pentru a crea o hartă cromozomială

1. Accesați BLAST pe site -ul NCBI la adresa http://www.nlm.nih.gov/BLAST . Localizați și selectați categoria **Aliniați** *două secvențe folosind BLAST (bl2seq)* . Situată în partea de jos a paginii principale BLAST , funcția bl2seq ne permite să comparăm două secvențe de ADN pentru a vedea dacă există alinieri pe baza similarității secvențelor .
2. Mai jos sunt opt secvențe contigue , preluate dintr -o secvență reală de cromozomi umani depusă în GenBank. Pentru acest exercițiu, am folosit fragmente scurte ; cu toate acestea, în realitate, secvențele contigue au de obicei câteva mii de perechi de baze . Pentru a finaliza acest exercițiu, copiați și lipiți oricare două secvențe în funcția *Align* din BLAST și apoi efectuați o aliniere (făcând clic *pe Align). (Indiciu:* Accesați aceste secvențe prin intermediul site-ului web însoțitor al cărții , astfel încât să le puteți copia și lipi cu ușurință.) Repetați acești pași cu alte combinații de două secvențe pentru a determina care secvențe se suprapun , apoi utilizați ceea ce descoperiți pentru a crea o hartă de secvențe care plasează secvențele contigue suprapuse în ordinea corectă. Iată câteva sfaturi de reținut :
   - Dezvoltă o strategie pentru a te asigura că analizezi alinierile tuturor perechilor de contigo.
   - Luați în considerare doar alinierile suprapuse care prezintă o similaritate de 100 % între secvențe.

Secvența A

CTAAI lililí IGTAI I I I IAATAGA-
GACGAGGTGTCACCATGTTGGACA-
GGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCA-
GGTGATCTGCCCACCTCAGCCTCC-
CAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGA-
GACGAGGTGTCACCATGTTGGACA-
GGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCA-
GGTGATCTGCCCACCTCAGCCTCC-
CAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGA-
GCCACCACTCCCAGGCTTTATTTACT- AI
ICCAAIII ICCATGATCCATTCAG-
GGTTTTGATTTGCAI III ICTATGA-
CAATGAACAATGTTTCATGTGCTT-
GTTGGCTGTTTGTATATCC IIIIII G-
GGAAAATACCAATTCATGTCCTTT-
GCCCATTTTTAAAGTGGATTGCATG-
TCTTTGTTGTTTAG- IGTGATTGATT IGT
IGCAT TIGAGACCGGTCG-
TCGCTTGATTGCATG
CAGAGGCATGATCTCGGCTGACTG-
CAATCCCCCACCTCCTGGCATCAAGA-
AGTTCCTCCTCCTGACCTTCCAAG-
TAGCTGGGTTTACAGATGC

Secvența B

CTTTATCTCAGGACAATGAACCCG-
CAAGGAGAGGAAGAGCCAGTA-
ATTCTATAGAGACTCGGAGGCGCA-
GGGGGCACGCTTAGTTAGAGTGG-
TGGTGGTATTTCAGTGTTTTCT-
GGTTTTATGATAAACACAAGCAT-
CAATGTCTCAAGACTTTCATCTIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
CTIIIGGIII TCACCCAGGCTGGAGTGCATT- G
GTG GTGTG ATCTTG G CTTTCTG-
TAACCTCGGGCTTCTGGGCTCA-
AGCCGTTCTACTACCTCAGCCTCC-
CAAATAGCTAGAACTACAAGCGTG- TG
CTGCC ACCTG-GCTATTGTTG
GTATTTTATTTATTCATTTAI II TIGT-

(continuare)

Explorarea genomicii (continuare)

GAAGACAAGGTCTTGCCATGTTGCC-
CAGGCTGGTCTCAGACTCCTGGGCT-
CAAGCAATCCACCACCTTAGTCT-
CCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGT-
GAGCCACCACACCA

Secvența C

GGAATTTCACTCTTTGTTGCCCAAG-
TTGGAGTGCAATGGCGCGATCT-
CAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCC-
CAGGTTCAAACGATTCTCCTGCTT-
CACTCTCCCCAGTAGCTGGGATTA-
CAGGCTGCACCACCACCTGGC- TAAI IIII II
IGTAGAI- I IATAGAI GACCGGGATCACCAT
GGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCA-
GGTGATCTGCCCACCTCAGCCTCC-
CAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGA-
GCCACCACTCCCAGGC

Secvența D

GCTTCATCTTTCTCTTCACCG-
TAAAACAGGAAAGTGTGTGGT-
CACCAGTATTTTAAGGCAAAGG-
CACTTACAGAGAATTAAGCATTT-
GACAAAATTTTTTACAGATATTT-
GTCTGTGGACCACTTCCGCACCA- G CTGTG
C ATG AG AG GG CTC
ATTGATTGCTGCTGCTGTT-
CACCCAGGAGACCGTTTCCCAGAT-
CACGCAAACGCTGCCTTCCCCCA-
CACCAGGGCCCTCAGCATGGGAAT-
GACCTTCCAGCGCTGCACGTTTCCA-
ATCCATGCTTG I II I I CAGTTCCTGG-
CTCACAGAGGACTGCTGGTGTCCAAG-
CAAACTTGGTTCTACT

Secvența E

CCTTAAGTGATCTACCTGTCTCT-
GCCCTCTCAAGTGCTGGGATTGCA-
GGCATAAGCCGCCATGCCCGGCC-
CAAAGTTTCTTTATATGTGCTGGA
TACTAGGCCCGTAACAGATATACA
ATTTGTAAATATTTTCTCTCATTTTGA AG
ATTTTCTTTTC ACTTTCTTG ATA
ATGTCCTTTGTGTAI II I II G ATA AT
GTCCTTTGATACAAAAG 1111 IA
AGGTTTTGAT AG ICCATTA ICC ITC ITT

Secvența F

TGTTTGTTTGTTTGTTTGTTT
CATTTTGTTTTTGAGACAGAGTCTT
GTTCTGTCGCCCAGTGTAGAGTG
CAGTGGCATAATCTCGGCTCACCG
TAACCTCCGCCTCCCGGGTTCAAG
CAACTCTGCCTGCCTCAGCCTCCCA
AGGAGCTGGGATTATAGACGCCCAC
CACCATGC I IGTIGTAG IGT IGT IGGTAG
GCCATTTTGGCCAGGCTGGTCTT
GAACTCCTGACCTCAGGTGATCT
GCCCACCCTGGCCTCTCAAAGT
GCTGGGATTACAGGTGTGAGCTGC
CACACTCGGCCACAACAAA IIII IG
CACCAGTTGCTCAC A

Secvența G

TC CTTTG ATA CAC A AAA G TTTTT A
AGTTTGATGAAGTTCAATTTACC
TATTATTTTCTTTTGTTG TTC ATT C
ATTTTGTGTC CTATGTAG GA ATC
TATTGCCAAATTCAAGGTGATAAA
GATTTACCCCTATGTTTCCTTCTA
AGAGTTTTATTTTATTGTTTTAGACTTAGCCTA
TTTAGTTATTTATTCAGTGTCAGGTGATAAA I
CT I I AGTTCAGGATC
CAAGTGAAAGGGGCATCTCTATCT
GGGACATGCCATTCTCATGACAGA
GGAAAAAGACAAAAACTGACACATA
CAATGACTTTTAAAACTTCACTCA

Secvența H

GG GTTTTTCTTTTG AG AC G GA G -
TCTCGCTGTCGCCTAGGCTGGAGT-
GCAGAGGCATGATCTCGGCTGACT-
GCAATCCCCCACCTCCTGGCATCA-
AGAAGTTCTCCCTGCCTCAGCCTTC-
CAAGTAGCTGGGTTTACAGATGCC-
CACCACCAT IIIGGC- IGTTAGACGG
ITTAGACGC
CATGTTGGCCGGGCTGGTCTGGA- ACTCCTA
ACCTTAAGTG ATCTACCT-
GTCTCTGCCTCTCAAAGTGCTGG-
GATTGCAGGCATAAGCCGCCATGCC-
CGGCCCAAAGI I ICII IATATGTGCT-
GGATACTAGTAGCCTAGTAGTAGTA

3. Pe baza rezultatelor alinierii , răspundeți la următoarele întrebări, în care secvențele sunt menționate în funcție de codul lor literic (de la A la H) :

   a) Care este ordinea corectă a virgulelor suprapuse?
   b) Care este lungimea, măsurată în număr de nucleotide, a fiecărei suprapuneri de secvențe dintre contiguri?
   c) Care este dimensiunea totală a segmentului cromozomial pe care a reușit să îl asambleze?
   d) Ai găsit vreun contigo care să nu se suprapună cu niciunul dintre celelalte? Explică-ți răspunsul.

4. Efectuați o căutare BLAST nucleotidă-nucleotidă (BLASTn) cu oricare dintre contigurile suprapuse pentru a determina din ce cromozom au fost preluate aceste contiguri *și* comentați rezultatele obținute.

Puntos de resumen

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

1. Metodele computerizate de secvențiere a ADN-ului de mare randament, combinate cu bioinformatica, permit oamenilor de știință să asambleze hărți de secvențe ale genomurilor complete .
2. Bioinformatica este esențială pentru analiza genomurilor și proteomilor. Bioinformatica aplică instrumente hardware și software , împreună cu instrumente statistice, la analiza datelor secvențiale biologice .
3. Adnotarea este utilizată pentru a identifica secvențele de ADN care codifică proteine și secvențele necodificatoare, cum ar fi elementele de reglare, în timp ce programele bioinformatice sunt utilizate pentru a identifica cadrele de citire deschise care permit prezicerea posibilelor polipeptide codificate de o secvență completă .
4. Genomica funcțională prezice funcția genelor pe baza analizei secvențelor .
5. Proiectul Genomului Uman a oferit multe surprize despre genetica speciei umane, inclusiv numărul de gene, gradul ridicat de similaritate dintre secvențele de ADN ale diferitelor ființe umane și dintre oameni și alte specii .

specii și a arătat , de asemenea, că multe gene codifică mai multe - proteine.

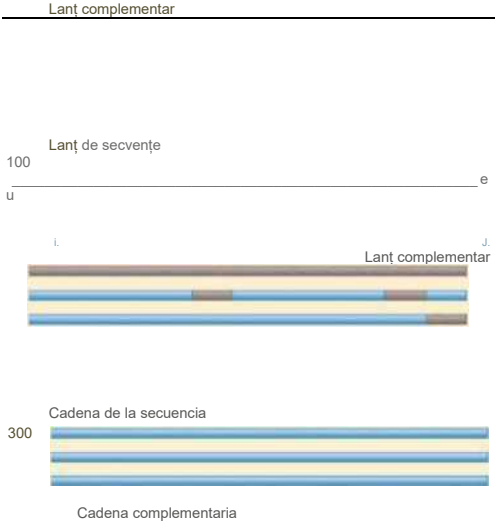
6. Genomica a dat naștere unor discipline conexe, denumite „omică", care schimbă rapid modul în care biologii moderni studiază ADN-ul, ARN-ul, proteinele și multe aspecte ale funcției celulare.
7. Genomurile multor organisme model importante au fost finalizate. Analiza genomică a organismelor model procariote și eucariote a relevat asemănări și diferențe fundamentale importante în ceea ce privește dimensiunea genomului, numărul de gene și organizarea genomică .
8. Studiile de genomică comparativă dezvăluie asemănări și diferențe fascinante între genomurile diferitelor organisme, inclusiv identificarea și analiza familiilor de gene .
9. Metagenomica , sau genomica mediului, secvențiază genomurile - microorganismelor prelevate din probe de mediu, identificând adesea noi secvențe care codifică proteine cu funcții noi.
10. Cipurile ADN sunt utile pentru analiza transcriptomului , permițând studierea simultană a modelelor de expresie a mii de gene .
11. Metode precum electroforeza bidimensională în gel și spectrometria de masă sunt foarte utile pentru analiza proteomelor - conținutul de proteine al unei celule.
12. de biologie a sistemelor sunt concepute pentru a oferi o înțelegere integrată a interacțiunilor dintre gene, proteine și alte molecule care guvernează procesele biologice complexe.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Una dintre principalele probleme legate de adnotarea genelor este decizia privind lungimea unei presupuse regiuni de frecvență deschisă (ORF) înainte de a fi acceptată ca genă. Mai jos sunt *prezentate trei analize ORF diferite* din aceeași regiune a genomului E. coli . —regiunea care conține gena *lacY* . Regiunile afișate cu maro indică cadrele ORE. Analiza superioară a fost configurată să accepte cadre ORF de 50 de nucleotide ca gene . Analizele din mijloc și inferioară au acceptat cadre ORF de 100, respectiv 300 de nucleotide ca gene . Câte gene presupuse au fost detectate în fiecare analiză? Cel mai lung ORF are 1.254 de perechi de baze; următorul cel mai lung are 234 de perechi de baze , iar cel mai scurt are 54 de perechi de baze . Cum putem determina numărul real de gene din această regiune? În acest tip de analiză a cadrelor ORF , este numărul de gene din genom mai probabil să fie supraestimat sau subestimat? De ce?

   Soluție. În general, putem examina secvențe conservate în alte organisme care indică faptul că un anumit ORF este probabil o regiune codificatoare. De asemenea, putem încerca să găsim potriviri între secvența de interes și alte secvențe scrise anterior, despre care se știe că codifică proteine . Problema nu este ușor de rezolvat - adică nu este simplu să decidem care ORF este de fapt o genă. Cu cât analiza cadrului ORF este mai scurtă , cu atât este mai probabil să supraestimăm numărul de gene, deoarece ORF-urile mai lungi de 200 de nucleotide sunt mai puțin susceptibile să apară întâmplător . În aceste analize , rețineți că utilizarea a 50 de perechi de baze produce cel mai mare număr de gene posibile , în timp ce analiza a 300 de perechi de baze produce cel mai mic număr (1) de gene posibile.

2. Secvențierea regiunilor heterocromatice (secvențe bogate în repetiții concentrate în zonele centromerice și telomerice) ale genomului *Drosophila* relevă 297 de gene care codifică proteine în 20,7 Mb (Bergman et al. 2002. genomebiology3(12)(>genomebiology.com/2002/3/12/RESEARCH/0086). Având în vedere că regiunile eucromatice ale genomului conțin 13.379 de gene care codifică proteine în 116,8 Mb , ce concluzie generală putem trage?



   Șir de secvență

   Soluție. Densitatea genelor în regiunile eucromatice ale genomului Drosophila este *de aproximativ* o genă la 8.730 de perechi de baze, în timp ce densitatea genelor în regiunile heterocromatice este de o genă la 70.000 de baze (20,7 Mb/297). În mod evident, o anumită regiune de heterocromatină este mult mai puțin probabil să conțină o genă decât o regiune eucromatică de aceeași dimensiune.

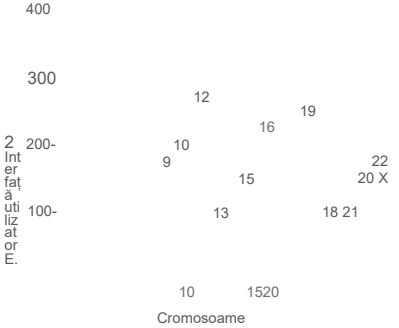
Probleme și întrebări pentru discuții

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

DUPĂ CUM ȘTIM .

1. În acest capitol, ne -am concentrat pe analiza genomului , transcriptomului și proteomului și am văzut aplicații și descoperiri importante derivate din această lucrare. Pe parcursul procesului , am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații . Pe baza explicațiilor oferite în capitol, cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum știm care celule fac parte din același cromozom?
   (b) Cum știm dacă o secvență de ADN genomic conține o genă care codifică o proteină ?
   (c) Ce dovezi susțin conceptul conform căruia oamenii au o similaritate substanțială în ceea ce privește secvențele genetice și funcțiile cu -organismele model ?
   (d) Cum poate proteomica identifica diferențele dintre numărul de gene care codifică proteine prezise pentru un genom și numărul de proteine exprimate de acel genom?
   (e) Ce dovezi indică faptul că familiile de gene sunt rezultatul unor evenimente de duplicare a genelor ?
   (f) demonstrat cipurile ADN că, deși toate celulele dintr-un organism au același genom, unele gene sunt exprimate în aproape toate celulele, în timp ce alte gene prezintă un nivel de exprimare specific celulei și țesutului ?

2. Ce este genomica funcțională ? Prin ce se diferențiază de genomica comparativă ?
   Indicați asemănările și deosebirile dintre secvențierea prin fragmente selectate aleatoriu ale unui genom întreg și tehnicile de clonare prin cartografiere .
4. Ce caracteristici au în comun genomurile bacteriene cu genomurile eucariote , dacă există?
5. Ce este bioinformatica și de ce este această disciplină esențială pentru studiul genomurilor ? Oferiți două exemple de aplicații ale bioinformaticii.
6. Enumerați și descrieți trei dintre principalele obiective ale Proiectului -Genomului Uman .
7. În ce moduri tehnicile de mare randament , cum ar fi secvențierea computerizată de ultimă generație și spectrometria de masă , facilitează cercetarea în genomică și proteomică ? Explicați răspunsul.
8. Căutările BLAST și aplicațiile aferente sunt esențiale pentru analiza secvențelor de gene și proteine. Definiți BLAST, descrieți funcțiile de bază ale acestui instrument software și oferiți un exemplu de informații returnate de o căutare BLAST.
   Ce sunt pseudogenele și cum sunt generate?
9. Descrieți genomul uman în funcție de dimensiunea sa , procentul din genom care codifică proteine, ce proporție este compusă din secvențe
10. repetitive și câte gene conține . Descrieți alte două caracteristici ale genomului uman.
    Comparați organizarea genelor bacteriene cu cea a eucariotelor. Ați putea cita câteva dintre principalele diferențe? Proiectul Genomului Uman a arătat că la oameni de toate rasele și naționalitățile, aproximativ 99,9 % din secvență se potrivește, totuși diferite persoane pot fi identificate folosind diverse tehnici.
12. amprentei genetice. Ați putea cita una dintre principalele variații ale genomului uman care poate fi utilizată pentru a distinge între diferite
13. persoane? Explicați pe scurt răspunsul dumneavoastră.
    Sarcina de adnotare implică identificarea genelor și a secvențelor de reglare a genelor din cadrul unui genom. Enumerați și descrieți caracteristicile unui genom care sunt esențiale pentru identificarea genelor dintr -o secvență necunoscută . Ce caracteristici ați căuta într-un genom procariot ? Și într -un genom eucariot ?
14. Datorită Proiectului Genomului Uman (HGP), în 2003 a fost publicată o secvență relativ precisă a genomului uman , derivată din eșantioane grupate de la diferiți indivizi. Această secvență este utilizată ca referință pentru genomurile haploide . Recent, genomurile mai multor persoane au fost secvențiate sub auspiciile Proiectului Genomului Personal (PGP). În ce moduri diferă rezultatele PGP de cele ale HGP? Descrieți importanța proiectului Genome 10K .
15. S-ar putea spune că biologia modernă trece printr -o revoluție „omică”.
16. Ce înseamnă asta ? Explicați răspunsul.
    Studiile metagenomice generează cantități enorme de date secvențiale . Oferiți exemple de informații genetice pe care le putem învăța din metagenomică .
    Ce sunt cipurile genetice ? Cum se folosesc?
    Într-o schiță de adnotare și rezumat al secvenței genomului uman, E.A.
18. Wright și colegii săi (Genome Biol. 2001; 2 (7): Research0025) au
19. prezentat un grafic similar cu cel de mai jos. Acest grafic oferă numărul aproximativ de *gene de* pe fiecare cromozom care sunt exprimate numai în embrioni . Revedeți informațiile furnizate în text despre aneuploidiile cromozomiale umane și corelați aceste informații cu graficul . Oferă acest grafic vreo perspectivă asupra motivului pentru care apar unele aneuploidii și altele nu ?



20. Adnotarea secvenței genomului uman relevă o discrepanță între numărul de gene care codifică proteine și numărul de proteine prezise de genom . Analiza proteomică indică faptul că celulele umane sunt capabile să sintetizeze peste 100.000 de proteine distincte , iar numărul real poate fi de trei ori mai mare. Ce discrepanță reflectă aceste date și cum poate fi rezolvată această discrepanță?

Problemas extrapicantes

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

21. Secvențierea genomică a deschis calea către numeroase studii care ne ajută să înțelegem forțele evolutive care modelează structura genetică a organismelor . Folosind baze de date care conțin secvențele a 25 de genomuri, un număr de oameni de știință (Kreil, DP și Ouzounis, CA, *Nucl. Acids Res.* 29: 1608-1615, 2001) au examinat relația dintre conținutul de GC și compoziția generală de aminoacizi . Aceștia au descoperit că este posibil să se identifice speciile termofile exclusiv pe baza compoziției lor de aminoacizi, sugerând că evoluția într- un mediu cald exercită o presiune selectivă în favoarea unei anumite compoziții de aminoacizi a întregului organism. Cum ar putea evoluția în medii extreme influența compoziția genomică și cea de aminoacizi ? Cum ar putea evoluția în medii extreme influența interpretarea datelor secvenței genomice ?

22 Familia de gene a β -globinei este compusă din 60 kb de ADN, deși doar 5 % din ADN codifică produse genetice. Justificați cât mai mult posibil restul de 95% din ADN.

23. Într-o secvență de 99,4 % din regiunile eucromatice ale cromozomului 1 uman , Gregory și colaboratorii săi (Gregory, SG și colab., *Nature,* 441: 315-321, 2006) au identificat 3.141 de structuri genetice .
    (a) Cum putem identifica o genă într -o secvență brută de baze de ADN ?
    (b) Ce proceduri sunt utilizate de obicei pentru a verifica probabilele atribuiri genetice ?
    (c) Având în vedere că cromozomul 1 conține aproximativ 8 % din genomul uman și presupunând că există aproximativ 20.000-25.000 de gene, ați considera cromozomul 1 ca fiind „ bogat în gene "?

24. M. Stoll și colegii săi au comparat loci candidați la oameni și șobolani în căutarea unor loci în genomul uman care probabil contribuie la constelația factorilor care cauzează hipertensiunea arterială. În aceste investigații, au identificat 26 de regiuni cromozomiale despre care cred că ar putea conține gene ale hipertensiunii arteriale . Cum ar putea ajuta genomica comparativă la identificarea genelor responsabile pentru o boală umană atât de complexă? Cercetătorii susțin că compararea loci candidati de la șobolani și oameni cu cei de la șoareci ar putea ajuta la validarea studiilor lor . De ce ar fi așa?

25. Compararea genomului uman și al cimpanzeilor indică faptul că o genă care funcționează ca o genă normală sau de tip sălbatic la o primată poate acționa ca o genă cauzatoare de boli la alta (The Chimpanzee Sequence and Analysis Consortium, *Nature,* 437: 69-87, 2005). De exemplu, locusul *PPARG (* regulator al diferențierii adipocitelor) este asociat cu diabetul de tip 2 la oameni, dar funcționează ca o genă de tip sălbatic la cimpanzei. Ce factori ar putea cauza această contradicție aparentă? Considerați astfel de contradicții aparente rare sau comune? Ce impact ar putea avea aceste descoperiri asupra utilizării genomicii comparative în identificarea și conceperea terapiilor pentru genele cauzatoare de boli la oameni?

26. Descoperirea faptului că *M. genitalium* are un genom de 0,58 Mb și doar 470 de gene care codifică proteine a stârnit interesul pentru determinarea numărului minim de gene necesare într -o celulă vie. În timp ce se căutau organisme cu genomuri din ce în ce mai mici, o nouă specie de archaea, *Nanoarchaeuni equitans,* a fost descoperită într-un orificiu hidrotermal la temperatură înaltă de pe fundul oceanului . Această procariotă are una dintre cele mai mici dimensiuni de celule descoperite vreodată , iar genomul său constă din doar aproximativ 0,5 Mb. Cu toate acestea, organismele precum *M. genitalium, N. equitans* și alți microbi cu genomuri foarte mici sunt fie paraziți , fie simbioți. Cum afectează acest lucru căutarea genomului minim? Ar trebui modificată definiția dimensiunii minime a genomului pentru o celulă vie?

Cerdos transgénicos producidos incorporando en el genoma del cerdo un vector vírico portador del gen de la medusa que codifica la proteína de fluorescencia verde. En el centro de la fotografía se muestra un cerdo no transgénico.

22

Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei

CONCEPTE CAPITOL

- ului recombinant, ingineria **genetică și** biotehnologia au revoluționat medicina și **agricultura** .

Plantele și animalele modificate genetic pot fi utilizate ca bioreactoare pentru a produce proteine terapeutice și alte produse proteice utile .

►► Modificările genetice ale plantelor au făcut posibilă obținerea unor culturi rezistente la erbicide și pesticide, precum și a unor culturi cu o valoare nutritivă mai mare; în mod similar, se creează animale transgenice pentru a produce proteine terapeutice și a proteja animalele de boli.

►► **Un genom sintetic** a **fost** asamblat cu succes și transplantat **într-** o tulpină bacteriană donatoare, sporind interesul pentru potențialele aplicații ale biologiei **sintetice** .

►► Aplicațiile **tehnologiei ADN-ului recombinant** și ale genomicii au devenit esențiale pentru **diagnosticarea** tulburărilor genetice, determinarea **genotipurilor** și **analiza** genomului uman în scopul detectării bolilor.

GWAS) analizează sute sau mii de diferențe genetice în încercarea de a lega variațiile genomice de trăsături și boli specifice.

►► Farmacogenomica și proiectarea rațională a medicamentelor au condus la producerea de medicamente personalizate, bazate în principal pe genotipul unei persoane .

►► Terapia genică este utilizată, transferând copii clonate ale alelelor funcționale către țesuturile țintă, pentru a trata tulburări genetice.

►► Aproape toate aplicațiile ingineriei genetice și biotehnologiei ridică dileme etice nerezolvate , cu implicații morale, sociale și juridice semnificative.

Încă de la începuturile tehnologiei ADN-ului recombinant, în anii 1970, oamenii de știință au folosit ingineria genetică nu numai pentru cercetarea biologică, ci și pentru *aplicații în* domeniile medicinei, agriculturii și biotehnologiei. Termenul „inginerie genetică" se referă la modificarea genomului unui organism și implică de obicei utilizarea tehnologiilor ADN-ului recombinant pentru a adăuga o genă sau o serie de gene la un genom. Deși poate implica și ștergerea unei gene, capacitatea de a manipula ADN-ul *in vitro și* de a introduce gene în celule vii a permis oamenilor de știință să genereze noi varietăți de plante, animale și alte organisme cu trăsături genetice specifice, precum și să fabrice produse terapeutice mai ieftine și mai eficiente. Aceste noi varietăți de organisme sunt numite organisme - modificate genetic sau OMG-uri. Analiștii din industrie - estimează că ingineria genetică va genera produse comerciale în valoare de peste 55 de miliarde de dolari anual numai în Statele Unite. Multe dintre aceste produse comerciale vor fi dezvoltate de industria biotehnologiei .

Biotehnologia este utilizarea organismelor vii pentru a crea un produs sau un proces care ajută la îmbunătățirea calității vieții oamenilor sau a altor organisme. După cum vom vedea în curând, biotehnologia a început ca o industrie modernă foarte curând după dezvoltarea tehnologiei ADN-ului recombinant . Dar biotehnologia este, de fapt, o știință care datează din cele mai vechi timpuri ale civilizației, când microbii au fost folosiți pentru prima dată pentru a fabrica multe produse importante, inclusiv vin și bere , oțet, pâine și brânză. Biotehnologia modernă utilizează pe scară largă tehnologia ADN-ului recombinant, ingineria genetică și aplicațiile genomice, iar acest capitol se va concentra pe aceste domenii. Produsele existente și noile dezvoltări care apar zilnic fac din industria biotehnologiei unul dintre sectoarele cu cea mai rapidă creștere în domeniul ocupării forței de muncă, cuprinzând aproximativ 5.000 de companii din 54 de țări.

Dezvoltarea sectorului biotehnologiei și creșterea rapidă a numărului de aplicații ale tehnologiilor ADN au ridicat îngrijorări serioase cu privire la capacitatea noastră de a manipula genele și de a aplica tehnologii genetice. Ingineria genetică și biotehnologia au potențialul de a oferi soluții la probleme fundamentale la scară globală și de a modifica semnificativ modul în care oamenii interacționează cu lumea naturală; prin urmare , ele ridică întrebări etice, sociale *și* economice cu care omenirea nu s-a confruntat niciodată până acum . Aceste probleme complexe nu pot fi analizate pe deplin într-o carte precum acest text introductiv despre genetică.

Prin urmare, în acest capitol vom prezenta doar o selecție de aplicații care ilustrează puterea ingineriei genetice și a biotehnologiei, precum și complexitatea dilemelor pe care le ridică. Vom începe prin a explica modul în care ingineria genetică a modificat plante și animale de mare importanță pentru sectoarele agricol și zootehnic . Vom descrie pe scurt modul în care ingineria genetică a afectat fabricarea produselor farmaceutice și vom - examina impactul tehnologiilor genetice asupra diagnosticării și tratamentului bolilor umane, inclusiv tehnicile de terapie genică . În cele din urmă, vom explora unele dintre implicațiile sociale, etice și juridice ale ingineriei genetice și biotehnologiei .

Analiza criminalistică a ADN-ului și aplicațiile bazate pe tehnologii care utilizează ADN-ul în scopuri de identificare sunt abordate în Capitolul Special I, Genetică criminalistică . În mod similar , o discuție mai amplă despre medicina personalizată bazată pe genetică este prezentată în Capitolul Special II , Genomică și medicină personalizată.

22.1 Organismele modificate genetic sintetizează o gamă largă de produse biologice și farmaceutice.

Cea mai răspândită și de succes aplicație a tehnologiei ADN-ului recombinant a fost producerea , de către industria biotehnologiei , de proteine recombinante ca produse biofarmaceutice - în special proteine terapeutice pentru tratarea bolilor. Înainte de era ADN-ului recombinant , proteinele biofarmaceutice precum insulina , factorii de coagulare și hormonii de creștere erau purificate din țesuturi precum pancreasul, sângele și glanda pituitară . Evident , aprovizionarea cu aceste surse era limitată , iar procesele de purificare erau foarte scumpe . În plus, produsele derivate din aceste surse naturale puteau fi contaminate de agenți patogeni, cum ar fi virusurile. Acum, că genele umane care codifică proteine importante din punct de vedere terapeutic pot fi clonate și exprimate într-o varietate de tipuri de celule gazdă non-umane, avem surse mai abundente , mai sigure și mai puțin costisitoare de produse biofarmaceutice . Agricultura moleculară (biopharming) este un termen utilizat în mod *obișnuit* pentru a descrie producerea de proteine cu o valoare specifică la animale și plante modificate genetic .

În această secțiune, vom prezenta câteva exemple de produse terapeutice fabricate prin exprimarea genelor clonate în organisme transgenice și celule gazdă . Nu

ar trebui să surprindă cititorul faptul că printre principalele boli pentru care companiile de biotehnologie încearcă să dezvolte tratamente folosind terapii recombinante se numără cancerele, artrita, diabetul, bolile cardiovasculare și bolile infecțioase precum SIDA. Tabelul 22.1 oferă o scurtă listă a produselor recombinante importante care sunt sintetizate în prezent în animale transgenice, drojdii, plante și bacterii.

Producția de insulină de către bacterii

Multe proteine terapeutice au fost produse prin introducerea de gene umane în bacterii. În majoritatea cazurilor, gena umană este clonată într- o plasmidă, iar vectorul recombinant este apoi introdus în gazda bacteriană. Cantități mari de bacterii transformate sunt cultivate , iar proteina umană recombinantă este ulterior recuperată și purificată din extracte bacteriene .

Primul produs genetic uman fabricat folosind tehnologia ADN-ului recombinant a fost insulina, numită Humulin, autorizată pentru uz terapeutic în 1982 de către Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA), agenția guvernamentală americană responsabilă de reglementarea siguranței alimentelor și produselor farmaceutice, precum și a dispozitivelor medicale. În 1977, oamenii de știință de la Genentech, compania de biotehnologie din San Francisco fondată în 1976 de Herbert Boyer (unul dintre pionierii în utilizarea plasmidelor pentru tehnologiile ADN-ului recombinant) și Robert Swanson, au izolat și clonat gena insulinei și au reușit să o exprime în celule bacteriene. Genentech, al cărei nume este o abreviere a *tehnologiei* de inginerie *genetică* , este, de asemenea, considerată în general prima companie de biotehnologie din lume .

Anterior, insulina era extrasă chimic din pancreasul vacilor și porcilor din abatoare . Insulina este un hormon peptidic care reglează metabolismul glucozei . Persoanele care nu pot produce insulină au diabet, o boală care, în forma sa cea mai severă, tipul 1 , afectează peste două milioane de oameni numai în Statele Unite. Deși insulina umană sintetică poate fi produsă acum folosind un alt proces , este util să ne uităm înapoi la metoda originală modificată genetic, deoarece aceasta demonstrează atât potențialul , cât și provocările aplicării tehnologiei ADN-ului recombinant .

Grupuri de celule din pancreas sintetizează un polipeptid precursor numit preproinsulină. Pe măsură ce acest polipeptid este secretat din celulă, aminoacizii sunt scindați de la capetele și mijlocul lanțului . Aceste scindări produc molecula de insulină matură , care conține două lanțuri polipeptidice (lanțurile A și *B)* . unite prin *legături* disulfidice . Subunitatea A Conține 21 de aminoacizi , în timp ce subunitatea B conține 30.

În procesul original de bioinginerie , genele sintetice care codifică subunitățile A și B au fost construite folosind tehnici de sinteză a oligonucleotidelor (63 de nucleotide pentru polipeptida A și 90 de nucleotide pentru polipeptida B). Fiecare oligonucleotid sintetic a fost inserat într- un vector diferit , adiacent genei lacZ . care codifică forma bacteriană a enzimei β-galactozidază. Când este transferată la *o* gazdă bacteriană, gena lacZ și oligonucleotida

Exemple de produse biofarmaceutice modificate genetic, deja disponibile sau în curs de dezvoltare

Produs genetic	Boala la care se aplică	Tipul de oaspete
Eritropoietină	Scleroză multiplă, cancer	cultivate Celule de mamifere cultivate
Interferoni	Infarct miocardic acut, accident vascular cerebral, nanism	Celule de mamifere cultivate
Activator tisular al plasminogenului (tPA), hormon de creștere uman, anticorpi monoclonali împotriva factorului de creștere endotelial vascular (VEGF)	Cancere	Porci și oi modificate genetic Iepuri modificați genetic Capre modificate genetic
Inhibitor C1 al factorului VIII de coagulare uman	Hemofilia A	Celule de drojdie cultivate, banane, glicoproteină B din soia modificată genetic, tutun modificat genetic, soia, celule de mamifere cultivate
Antitrombină umană recombinantă, antigen de suprafață al hepatitei B, imunoglobulină IgG1 împotriva HSV-2, anticorpi monoclonali recombinanți	Angioedem ereditar Deficiență congenitală de antitrombină Infecțiile cu hepatita B Infecții cu herpesvirus Imunizare pasivă împotriva rabiei (utilizată și în diagnosticarea rabiei), cancerului, artritei reumatoide	Cartof (vacă comestibilă) Cartof (vacă comestibilă)
Proteina capsidei virusului Norwalk; enterotoxină termolabilă de *E. coli*	Infecțiile cu virusul Norwalk Infecții *cu E. coli*	*E. coli,* celule de mamifere cultivate *E. coli,* celule de mamifere cultivate Celule de mamifere
Anemie		

Proteinele sintetice adiacente au fost transcrise și traduse ca o singură unitate. Produsul este o proteină de fuziune - adică o proteină hibridă compusă din secvența de aminoacizi a β-galactozidazei legată de secvența de aminoacizi a uneia dintre subunitățile de insulină (Figura 22.1) . Proteinele de fuziune au fost purificate din extracte bacteriene și tratate cu bromură de cianogen , o substanță chimică care scindează proteina de fuziune β-galactozidază . La amestecarea produselor de fuziune, cele două subunități de insulină s-au unit spontan , formând o moleculă de insulină activă, intactă. Insulina injectabilă purificată a fost apoi ambalată pentru utilizare de către diabetici.

La scurt timp după ce insulina a devenit disponibilă, hormonul de creștere - utilizat pentru tratarea copiilor cu un tip de nanism - a fost clonat . Curând, tehnologia ADN-ului recombinant a făcut ca acest produs să fie disponibil pe scară largă, împreună cu o mare varietate de alte proteine importante din punct de vedere medical , care anterior erau dificil de obținut în cantități adecvate. De când insulina recombinantă a inaugurat era biotehnologiei , peste 200 de produse recombinante au fost lansate în întreaga lume .

Gazde animale modificate genetic și produse farmaceutice

Deși bacteriile au fost utilizate pe scară largă pentru fabricarea - proteinelor terapeutice, există unele dezavantaje ale utilizării gazdelor procariote pentru a sintetiza proteine eucariote . O problemă este că celulele bacteriene adesea nu pot procesa și modifica proteinele eucariote. Drept urmare, ele frecvent nu pot adăuga carbohidrații și grupările fosfat necesare pentru o activitate biologică completă. În plus, proteinele eucariote produse în celulele procariote adesea nu reușesc să se plieze în configurația tridimensională corectă și, prin urmare, sunt inactive. Pentru a depăși aceste dificultăți și a crește producția , multe produse biofarmaceutice sunt acum fabricate folosind gazde eucariote . După cum se arată în Tabelul 22.1, celulele eucariote cultivate (din plante sau animale) sau animalele de fermă transgenice pot fi utilizate ca gazde eucariote. O turmă de capre sau vaci este foarte eficientă ca bioreactor sau biofabrică - fabrici vii -, producând continuu lapte care conține proteina terapeutică dorită, care poate fi apoi izolată neinvaziv .

Drojdia este, de asemenea, o gazdă foarte utilă pentru exprimarea proteinelor recombinante. Chiar și celulele de insecte sunt utile în acest scop, datorită utilizării unui sistem

gena
de rezistență la antibiotice

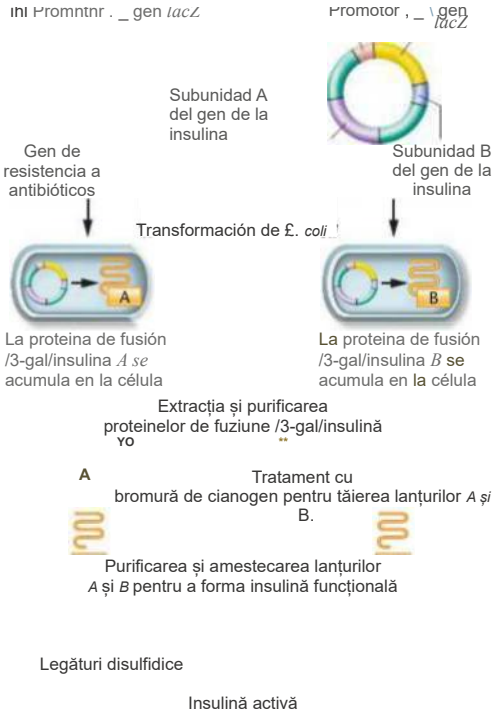

Promotor , _ gen lacZ
Subunidad A del gen de la insulina
Subunidad B del gen de la insulina
Gen de resistencia a antibióticos
Transformación de £. coli
A
B
La proteina de fusión /3-gal/insulina A se acumula en la célula
La proteina de fusión /3-gal/insulina B se acumula en la célula
Extracția și purificarea proteinelor de fuziune /3-gal/insulină
A
Tratament cu bromură de cianogen pentru tăierea lanțurilor A și B.
Purificarea și amestecarea lanțurilor A și B pentru a forma insulină funcțională
Legături disulfidice
Insulină activă

FIGURA 22.1 (a) Humulina, o formă recombinantă de insulină umană, a fost prima proteină terapeutică fabricată folosind tehnologia ADN recombinantă care a fost aprobată pentru utilizare la om. (b) Pentru a sintetiza insulina umană recombinantă , oligonucleotidele sintetice care codifică lanțurile *A și B* ale insulinei au fost inserate (în vectori separați) în coada unei gene *lacZ* clonate . Plasmidele recombinante au fost introduse în celule gazdă *E. coli* , în care a fost sintetizată și acumulată proteina de fuziune a insulinei β-gal/β . Proteinele de fuziune au fost apoi extrase din celulele gazdă și purificate. Lanțurile de insulină au fost eliberate din β-galactozidază prin tratare cu bromură de cianogen. Subunitățile de insulină au fost purificate și amestecate pentru a obține o moleculă de insulină funcțională.

Se utilizează virusuri care introduc gene , numite baculovirusuri. Baculovirusurile recombinante care conțin o genă de interes sunt utilizate pentru a infecta linii celulare de insecte, care apoi exprimă proteina la un nivel ridicat. Expresia baculovirus-celule de insectă este deosebit de utilă pentru producerea de proteine umane recombinante care sunt puternic glicozilate. Indiferent de gazdă, proteinele terapeutice pot fi apoi purificate din celulele gazdă - sau, atunci când se utilizează animale de fermă transgenice, izolate din produse de origine animală, cum ar fi laptele.

Un exemplu de produs biofarmaceutic sintetizat în animale transgenice este proteina alfa-1 antitripsină umană . Deficitul de alfa-1 antitripsină este asociat cu forma ereditară de emfizem, o - tulburare non-respiratorie progresivă și fatală, frecventă în rândul persoanelor de origine europeană. Pentru a produce alfa-1 antitripsină pentru tratamentul acestei boli, gena umană a fost clonată într-un vector la un situs adiacent unei secvențe promotoare de oaie care activează în mod specific transcripția în celulele producătoare de lapte din glandele mamare ale oilor. Genele situate lângă acest promotor sunt exprimate numai în țesutul mamar. Această genă de fuziune a fost microinjectată în zigoți de oaie fertilizați in vitro . Zigoții fertilizați au fost apoi transferați la mame surogat. Oile transgenice rezultate s-au dezvoltat normal și au produs lapte care conține concentrații mari de proteină alfa-1 antitripsină umană funcțională. Această proteină umană este prezentă în concentrații de până la 35 de grame pe litru de lapte și poate fi ușor extrasă și purificată. Un grup mic de oi de lapte transgenice poate oferi o cantitate abundentă de această proteină.

În 2006, antitrombina umană recombinantă , o proteină anticoagulantă, a devenit primul medicament din lume derivat din laptele animalelor de fermă aprobat pentru uz uman. Oamenii de știință de la GTC Biotherapeutics din Framingham, Massachusetts, SUA, au introdus gena antitrombinei umane la capre. Prin plasarea genei adiacent unui promotor al beta-cazeinei, o proteină comună din lapte, oamenii de știință de la GTC au reușit să inducă expresia antitrombinei în glanda mamară. Drept urmare, proteina antitrombină este exprimată la niveluri ridicate în lapte. Într-un singur an, o singură capră va produce o cantitate de antitrombină echivalentă cu ceea ce s-ar fi obținut anterior prin izolarea acesteia din 90.000 de probe de sânge.

Într-un exemplu similar, dar cu o aplicație non-biofarmaceutică, au fost dezvoltate așa-numitele capre transgenice „cu lapte de mătase" , care exprimă proteine din mătasea de păianjen în laptele lor . Aceste capre reprezintă o sursă abundentă de proteine din mătase utilizate pentru diverse aplicații comerciale, cum ar fi fabricarea vestelor antiglonț.

Tehnici de ADN recombinant pentru producerea de vaccinuri și plante vaccinale transgenice comestibile. Probabil una dintre cele mai promițătoare aplicații ale tehnologiei ADN recombinant în scopuri terapeutice este producerea de vaccinuri . Vaccinurile stimulează sistemul imunitar să producă anticorpi împotriva organismelor care cauzează boli , conferind astfel imunitate împotriva anumitor boli. În mod tradițional, au fost utilizate două tipuri distincte de vaccinuri : vaccinurile inactivate, care sunt preparate din probe distruse ale virusului sau bacteriilor infecțioase, și vaccinurile atenuate , care sunt virusuri sau bacterii vii care nu se mai pot reproduce, dar pot provoca o formă ușoară a bolii. Exemple de vaccinuri inactivate includ cele pentru rabie și gripă; vaccinurile pentru tuberculoză, holeră și varicelă sunt exemple de vaccinuri atenuate.

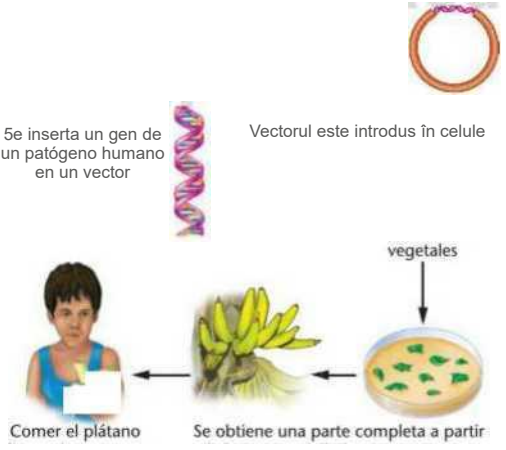
Tehnicile de inginerie genetică sunt utilizate pentru a produce un tip relativ nou de vaccin, numit vaccin subunitar, care este compus din una sau mai multe proteine de suprafață dintr-un virus sau o bacterie, dar nu include întregul virus sau bacteria. Această proteină de suprafață acționează ca un antigen care stimulează sistemul imunitar să producă anticorpi care acționează împotriva organismului din care derivă proteina. Unul dintre primele vaccinuri subunitare a fost realizat împotriva virusului hepatitei B, care provoacă leziuni hepatice și cancer. Gena care codifică proteina de suprafață a hepatitei B a fost clonată într-un vector de expresie al drojdiei , iar gena clonată a fost exprimată în celule gazdă de drojdie . Proteina a fost apoi extrasă și purificată din celulele gazdă și ambalată pentru utilizare ca vaccin.

În 2005, FDA a aprobat Gardasil, un vaccin subunitar fabricat de compania farmaceutică Merck, acesta fiind primul vaccin împotriva cancerului care a primit aprobarea FDA. Gardasil vizează patru tulpini ale virusului papiloma uman (HPV) , care cauzează aproximativ 70% din cazurile de cancer de col uterin. Aproximativ 70 % dintre femeile active sexual vor fi infectate cu o tulpină de HPV în timpul vieții. Gardasil este conceput pentru a oferi protecție imună împotriva HPV înainte de infecție , dar nu este eficient împotriva infecțiilor existente . În Statele Unite, Gardasil a atras o atenție semnificativă a mass-media datorită legislației dezbătute în unele state care ar impune tuturor fetelor adolescente să primească vaccinul Gardasil , indiferent de statusul lor sexual.

Țările în curs de dezvoltare se confruntă cu dificultăți serioase în fabricarea, transportul și depozitarea vaccinurilor. Majoritatea vaccinurilor necesită refrigerare și trebuie administrate în condiții sterile. În multe zone rurale, instalațiile de refrigerare și sterilizare nu sunt disponibile. În plus, în multe culturi, oamenii se tem de ace. Pentru a aborda aceste probleme, oamenii de știință încearcă să dezvolte vaccinuri care pot fi sintetizate în plante comestibile (Figura 22.2). Aceste vaccinuri ar fi ieftine de produs, nu ar necesita refrigerare și nu ar trebui administrate în condiții sterile de către profesioniștii din domeniul sănătății.

Plantele oferă și alte câteva avantaje în ceea ce privește exprimarea proteinelor recombinante. De exemplu, odată ce o plantă transgenică este obținută, aceasta poate fi cultivată și reprodusă într-o seră sau pe câmp, oferind astfel o sursă constantă de proteine recombinantă. În plus, costul exprimării unei proteine recombinante într-o plantă transgenică este de obicei mult mai mic decât cel al producerii aceleiași proteine în bacterii, drojdii sau celule de mamifere.

FDA nu a aprobat încă nicio proteină recombinantă exprimată în plante transgenice pentru utilizare.


5e inserta un gen de un patógeno humano en un vector
Vectorul este introdus în celule
vegetales
Comer el plátano
Se obtiene una parte completa a partir

declanșează răspunsul imun al fragmentelor de frunze care transportă gena agentului patogen uman la agentul patogen.

FIGURA 22.2 Pentru a prepara un vaccin comestibil, o genă a unui agent patogen (un agent patogen , cum ar fi un virus sau o bacterie) este transferată într-un vector. Vectorul este apoi introdus în celulele plantei. În acest exemplu, infecția celulelor din frunzele de bananier transferă vectorul și gena agentului patogen în nucleele celulare . Bucăți de frunze sunt cultivate pentru a produce plante de bananier mature care exprimă gena agentului patogen. Consumul bananei produse de aceste plante declanșează un răspuns imun la proteina codificată de gena agentului - patogen , conferind imunitate la infecția cu acest agent patogen. Unele vaccinuri comestibile sunt în prezent în studii clinice . De exemplu , un vaccin împotriva unei bacterii care provoacă holera a fost preparat folosind cartofi modificați genetic și utilizat cu succes pentru vaccinarea voluntarilor umani .

În prezent, se desfășoară studii clinice care utilizează banane și cartofi ca producători de vaccinuri. Bananele sunt considerate probabil cel mai bun candidat posibil pentru un vaccin comestibil împotriva hepatitei B. Plantele comestibile modificate genetic sunt utilizate în studiile care vizează vaccinarea copiilor și adulților împotriva multor boli infecțioase. Însă o serie de întrebări tehnice privind administrarea vaccinurilor pe bază de plante trebuie încă să primească răspuns pentru ca vaccinurile comestibile să fie utilizate pe scară largă. De exemplu, cum putem controla cu atenție doza de vaccin atunci când fructele și legumele cresc la dimensiuni diferite și exprimă cantități variabile de vaccin? Vor trece proteinele din vaccin nemodificate prin tractul digestiv , menținându-și capacitatea de a oferi protecție imună? În orice caz, perspectivele sunt foarte promițătoare .

În cele din urmă, merită menționat faptul că timp de mulți ani au existat încercări de a dezvolta vaccinuri pe bază de ADN , iar recent a existat un interes reînnoit în utilizarea acestor vaccinuri pentru a proteja împotriva agenților patogeni virali . Prin această tehnică, ADN-ul care codifică proteinele unui agent patogen specific este inserat într- un vector plasmidic , care este apoi injectat direct într- o persoană sau administrat prin intermediul unui vector viral, similar modului în care anumite virusuri sunt utilizate în terapiile genice. Ideea este că proteinele patogene codificate de ADN -ul administrat vor fi produse și vor declanșa un răspuns imun , oferind protecție în cazul în care o persoană imunizată va fi expusă la agentul patogen în viitor. De exemplu, se dezvoltă studii clinice utilizând ADN plasmidic care codifică antigenele proteinei HIV , în încercarea de a vaccina persoanele împotriva HIV. Până în prezent , una dintre principalele limitări ale vectorilor pe bază de ADN a fost aceea că aceștia determină de obicei o producție foarte scăzută a proteinei codificate de genele furnizate , rezultând un răspuns imun insuficient la persoanele vaccinate pentru a oferi nivelul dorit de protecție. Lucrările la vaccinurile pe bază de ADN rămân un domeniu activ de explorare, dar rămâne de văzut dacă acestea vor juca un rol semnificativ pe piața vaccinurilor .

ACUM REZOLVĂ ASTA

22.1 Pentru a vaccina oamenii împotriva bolilor prin ingerarea de antigene (cum ar fi toxina holerei) prezente într-un vaccin comestibil, antigenul trebuie să ajungă la celulele intestinului subțire. Ați putea sublinia câteva probleme potențiale ale acestei metode?

- **SUGESTIE.** *Această problemă implică înțelegerea proceselor asociate cu descompunerea parțială a alimentelor în timpul digestiei și a modului în care acestea pot afecta detectarea antigenului. Cheia rezolvării acestei probleme este de a lua în considerare necesitatea ca antigenele să își păstreze capacitatea de a stimula sistemul imunitar. Rețineți existența reacțiilor alergice la alimente sau la vaccinurile administrate oral.*

22.2

Ingineria genetică a plantelor a revoluționat agricultura

Timp de milenii, fermierii au manipulat structura genetică a plantelor și animalelor pentru a maximiza producția de alimente . Până la apariția ingineriei genetice, acum 30 de ani, aceste manipulări genetice se limitau în principal la ameliorarea selectivă - selecția și reproducerea variantelor naturale sau induse de mutageni. În ultimii 50 până la 100 de ani, îmbunătățirea genetică a plantelor de cultură prin metode tradiționale de selecție artificială și încrucișare a dus la creșteri enorme ale productivității și valorii nutritive. De exemplu, randamentele de porumb s-au cvadruplat în ultimii 60 de ani, iar mai mult de jumătate din această creștere se datorează îmbunătățirilor genetice rezultate din selecția artificială și ameliorarea selectivă (Figura 22.3). Porumbul modern are semnificativ mai multe boabe și spice mai mari decât soiurile mai vechi, inclusiv hibrizii din care a fost dezvoltat.

Tehnologia ADN-ului recombinant oferă instrumente noi și puternice pentru modificarea structurii genetice a organismelor importante din punct de vedere agricol. Oamenii de știință pot acum identifica, izola și clona gene care conferă anumite trăsături dorite și apoi pot introduce aceste gene în mod specific și eficient în organismele alese. Drept urmare, trăsături precum rezistența la insecte, rezistența la erbicide sau caracteristicile nutriționale pot fi introduse rapid în plantele și animalele de fermă, acesta fiind unul dintre principalele obiective ale biotehnologiei agricole. În această secțiune, vom analiza mai întâi manipulările genetice.

Zea canina hibridă *Zea mays*

FIGURA 22.3 Ameliorarea selectivă este una dintre cele mai vechi metode de modificare genetică a plantelor. Imaginea prezintă teosinte (Zea *canina,* stânga), un hibrid ameliorat selectiv (centru) și un știulete de porumb modern *(Zea mays).*

pentru a produce plante de cultură transgenice cu valoare agricolă. În Secțiunea 22.3 vom oferi exemple de manipulări genetice ale animalelor cu importanță agricolă.

La nivel mondial , până în 2010 (cel mai recent an pentru care există date disponibile) , peste 150 de milioane de hectare fuseseră plantate cu culturi modificate genetic, în special soia , porumb, bumbac și rapiță rezistente la erbicide și dăunători . Sunt disponibile peste 50 de soiuri diferite de culturi transgenice , inclusiv lucernă, porumb, orez, cartofi, roșii, tutun, grâu și merișor [Figura 22.4(a)]. Aceste culturi sunt cultivate de peste opt milioane de fermieri din 17 țări. După cum arată Figura 22.4(b) , atât țările industrializate , cât și cele în curs de dezvoltare beneficiază de culturile transgenice . Din 1996, s-a înregistrat o creștere de 4.000 % a suprafeței dedicate culturilor transgenice la nivel mondial .

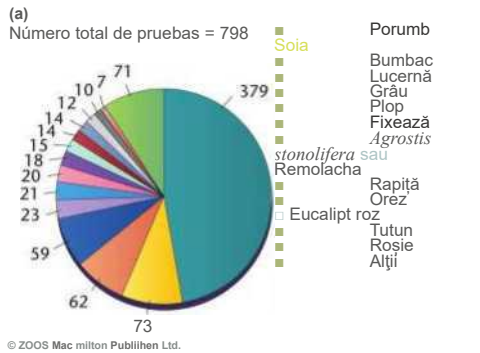


FIGURA 22.4 (a) Analiza a aproape 800 de teste cu culturi transgenice la nivel mondial arată că soiurile modificate genetic de porumb, soia, bumbac, lucernă și grâu se numără printre culturile cel mai frecvent manipulate *(Nature Biotechnology* 23(3), p. 281, martie 2005). (b) În ultimii 10 ani, culturile transgenice au fost adoptate rapid atât în țările industrializate, cât și în cele în curs de dezvoltare (Ernst & Young, Beyond *Borden: Global Biotechnology Report* 2006, www.ey.com/beyondborders . Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: 2 martie 2011, *Nature* 471, 10–11, Copyright 2011, www.nature.com).

Până în 2005, la a zecea aniversare a culturilor comerciale bazate pe biotehnologie, fuseseră deja plantate 400 de milioane de hectare de culturi biotehnologice. În 2004, fermierii americani au plantat 40 de milioane de hectare de porumb, soia și bumbac modificate genetic, o creștere de 17% față de anul precedent. În Statele Unite, 86% din soia, 78 % din bumbac și 46 % din porumb sunt modificate genetic pentru a rezista la dăunători sau erbicide.

Printre principalele motive pentru dezvoltarea culturilor modificate genetic putem cita:

- Îmbunătățirea caracteristicilor de creștere și a productivității culturilor cu valoare agricolă.
- Creșterea valorii nutritive a culturilor.
- Pentru a oferi culturilor rezistență la insecte și viruși, secetă și erbicide.

În plus, multe culturi noi modificate genetic care vor fi în curând pe piață vor fi concepute pentru producerea de etanol sau biodiesel - adică, pentru a oferi surse durabile de energie.

Prima plantă comestibilă modificată genetic disponibilă comercial a fost numită roșia *Flavr Savr* . Concepută de cercetătorii de la Calgene (acum o divizie a Monsanto , Inc.), *Flavr Savr* a fost concepută pentru a crește durata de valabilitate a roșiilor , permițându-le să rămână coapte timp de câteva săptămâni fără a se înmuia - o problemă frecventă a roșiilor. Oamenii de știință de la Calgene au folosit tehnologia ARN antisens pentru a inhiba o enzimă numită poligalacturonază, care digeră pectina din pereții celulari ai roșiilor . Digestia pectinei are loc în mod natural după ce roșiile sunt culese , iar acest proces este unul dintre principalele motive pentru care roșiile se înmoaie . Această tehnică de modificare genetică a fost în general eficientă , dar încercările de a aborda problemele continue de transport care făceau ca roșiile să se altereze au dus la creșterea costurilor . Acest lucru, împreună cu scepticismul publicului cu privire la siguranța primului aliment modificat genetic, sunt două dintre motivele pentru care Flavr *Savr* ... A ajuns să fie retras de pe piață .

Informațiile furnizate de proiectele de secvențiere a genomului plantelor vor cataliza, fără îndoială, analiza diversității genetice a plantelor de cultură, identificarea genelor implicate în domesticirea plantelor cultivate și în trăsăturile reproductive și îmbunătățirea ulterioară a unei varietăți de trăsături dezirabile prin tehnici de inginerie genetică . În trecut , au fost finalizate proiecte genomice multianuale pe multe culturi alimentare majore , inclusiv pe cele trei culturi care reprezintă majoritatea aportului caloric global :

porumbul , orezul și grâul . Vom examina acum alte exemple, mai reușite , de plante modificate genetic utilizate în agricultură . În secțiunea 22.7, vom trece în revistă unele dintre problemele etice și sociale asociate cu aceste practici .

Plante modificate genetic cu rezistență la dăunători și erbicide

Buruienile distrug aproximativ 10 % din culturile din întreaga lume. În încercarea de a combate această problemă, fermierii aplică adesea erbicide pe sol pentru a elimina buruienile înainte de a planta un câmp. Deoarece cele mai eficiente erbicide distrug și plantele de cultură în sine , utilizările acestor erbicide sunt limitate. Dezvoltarea culturilor rezistente la erbicide a deschis calea către un control eficient al buruienilor și a crescut randamentul unor culturi agricole. În prezent , peste 75 % din soia și bumbacul din Statele Unite sunt rezistente la erbicidul glifosat . Glifosatul poate fi familiar cititorului deoarece este ingredientul activ din multe produse erbicide disponibile comercial *(a se vedea* Figura 22.5) utilizate pentru a menține trotuarele și curțile fără buruieni.

Glifosatul este foarte eficient la concentrații foarte scăzute , nu este toxic pentru oameni și este descompus rapid de microorganismele din sol . Acesta ucide plantele prin inhibarea - acțiunii unei enzime cloroplastice numite EPSP sintază. Această enzimă este crucială pentru biosinteza aminoacizilor atât la bacterii, cât și la plante . Fără capacitatea de a sintetiza aminoacizi vitali, plantele se ofilesc și mor.

FIGURA 22.S (a) Glifosatul este ingredientul activ din Roundup, un erbicid utilizat în mod obișnuit, (b) Un câmp de porumb rezistent la glifosat infestat cu buruieni înainte (stânga) *și* după (dreapta) tratamentul cu un erbicid.

Reamintim din Capitolul 20 că *Rhizobium radiobacter* (numit anterior *Agrobacterium tumefaciens)* Este un microb din sol care poate infecta plantele deteriorate și poate crea ceea ce sunt cunoscute sub numele de gale coroanei sau tumori ale gâtului . *R. radiobacter* conține plasmide Ti, așa- numite deoarece conțin gene care induc tumori. Versiuni modificate ale plasmidelor Ti cărora le lipsesc genele care induc tumori și au alte caracteristici , cum ar fi rezistența la antibiotice , au fost utilizate pe scară largă ; aceste versiuni modificate ale plasmidelor sunt utilizate ca vectori pentru a introduce gene în plante . Pentru a produce o plantă de cultură rezistentă la glifosat, cercetătorii au început prin izolarea și clonarea unei gene EPSP sintază dintr - o tulpină de E. *coli* rezistentă la glifosat . Apoi *au* clonat gena EPSP . într -o plasmidă Ti , între secvențele promotorului derivate dintr -un fitovirus și secvențele de terminare a transcripției derivate dintr -o genă a plantei (Figura 22.6). Acest vector recombinant a fost apoi inserat în *R. radiobacter.*

Bacteria purtătoare a plasmidei Ti a fost apoi utilizată pentru a infecta celule obținute *din frunzele plantelor. Masele celulare (calusurile) formate după infecția cu R. radiobacter* au fost testate pentru capacitatea lor de a crește în prezența glifosatului . Calusurile rezistente *la* glifosat au fost cultivate pe plante transgenice și pulverizate cu glifosat la concentrații de patru ori mai mari decât cele necesare pentru a ucide plantele de tip sălbatic . Plantele transgenice care exprimă EPSP sintază au crescut și au prosperat , în timp ce plantele de control s - au ofilit și au murit . Figura 22.5 (b) prezintă eficacitatea glifosatului ca erbicid și rezistența plantelor de cultură rezistente la glifosat .

Tehnici transgenice similare au fost utilizate pentru a obține plante rezistente la diverse alte erbicide, agenți patogeni precum virusuri , dar și insecte dăunătoare . Unele dintre cele mai bine descrise și mai controversate culturi transgenice sunt culturile Bt, concepute pentru a fi rezistente la insecte . Bacteria Bacillus *thuringiensis* (Bt) produce o proteină care, atunci când este ingerată de insecte și larve, cristalizează în sistemul lor digestiv, ucigând dăunători precum larvele gărgăriței porumbului european , care sunt responsabile pentru pierderi de culturi în valoare de milioane de euro la nivel mondial . Inițial, aplicațiile Bt necesitau pulverizarea acestor bacterii pe culturi . Dar tehnologia ADN-ului recombinant a permis oamenilor de știință să obțină culturi transgenice Bt cu protecție insecticidă încorporată . Genele *cry* care codifică proteina cristalină Bt au fost introduse cu succes în diverse culturi, inclusiv porumb, bumbac, roșii și tutun .

Culturile Bt au fost aclamate ca fiind unul dintre cele mai mari succese ale biotehnologiei agricole , dar au fost și printre cele mai controversate. Unele studii au ...

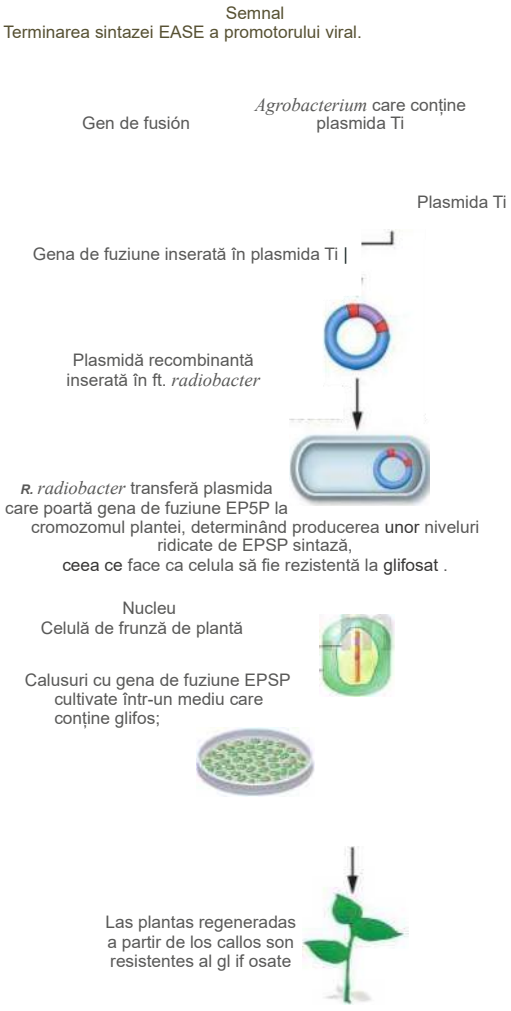

Semnal
Terminarea sintazei EASE a promotorului viral.
Gen de fusión
Agrobacterium care conține plasmida Ti
Plasmida Ti
Gena de fuziune inserată în plasmida Ti |
Plasmidă recombinantă inserată în ft. radiobacter
R. radiobacter transferă plasmida care poartă gena de fuziune EP5P la cromozomul plantei, determinând producerea unor niveluri ridicate de EPSP sintază, ceea ce face ca celula să fie rezistentă la glifosat .
Nucleu
Celulă de frunză de plantă
Calusuri cu gena de fuziune EPSP cultivate într-un mediu care conține glifos;
Las plantas regeneradas a partir de los callos son resistentes al gl if osate

FIGURA **22.6** Pentru a crea plante recombinante rezistente la glifosat, gena EPSP sintazei dintr-o bacterie este combinată cu un promotor , cum ar fi promotorul virusului mozaic al conopidei . Această genă fuzionată este apoi inserată într- un vector de tip Ti, iar vectorul recombinant este inserat în celulele gazdă R. *radiobacter* . Infectarea celulelor vegetale cultivate cu *R. radiobacter* transferă gena sintazei EPSP condensată la un cromozom al celulei vegetale. Celulele care dobândesc gena sunt capabile să sintetizeze cantități mari de EPSP sintază, ceea ce le face rezistente la erbicidul glifosat. Celulele rezistente sunt selectate prin creșterea lor într-un mediu care conține erbicidul . Plantele regenerate din aceste celule sunt rezistente la erbicid.

S-a sugerat o corelație între declinul populației de fluturi monarh și ingerarea de polen de porumb Bt (fluturii monarh nu se hrănesc cu porumb în sine). Mai recent, mai multe studii pe termen lung au arătat că expunerea la culturile Bt nu are niciun efect aparent asupra fluturilor monarh ; cu toate acestea, ori de câte ori se utilizează plante rezistente la dăunători, trebuie luată în considerare posibilitatea de a afecta speciile de insecte nedistructive. În plus, există îngrijorări că insectele dăunătoare pot dezvolta rezistență la Bt. Cu toate acestea, pe baza succesului culturilor Bt, se dezvoltă multe alte culturi modificate genetic , inclusiv plante cu o toleranță mai mare la dăunătorii virali, secetă și soluri saline.

Îmbunătățirea nutrițională a plantelor de cultură

Întrucât culturile pot fi deficitare în anumiți nutrienți necesari dietei umane, biotehnologia este utilizată pentru a obține culturi cu o valoare nutrițională îmbunătățită. Un exemplu este producția așa-numitului „orez auriu ” , cu niveluri mai ridicate de beta-caroten, un precursor al vitaminei A (Figura 22.7). Deficiența de vitamina A este răspândită în multe zone din Asia și Africa , iar peste 500.000 de copii rămân orbi permanent din cauza acestei deficiențe. Orezul este un aliment de bază în aceste regiuni, dar nu conține vitamina A.

Pentru a crea Orezul Auriu, oamenii de știință au transferat în genomul orezului trei gene care codifică enzime necesare pentru calea biosintetică care duce la sinteza β-carotenului, utilizând tehnologia ADN-ului recombinant. Două dintre aceste gene provin de la narcise , iar una de la o bacterie . Deși Orezul Auriu este deja disponibil pentru plantare, acesta produce doar niveluri moderate de β-caroten. În prezent, se dezvoltă noi soiuri cu o producție mai mare de β-caroten. Unul dintre aceste soiuri , Orezul Auriu 2, încorporează gena fitoen sintazei din porumb în loc de cea din narcise și produce de aproximativ 20 de ori mai mult β-caroten decât Orezul Auriu original. Acceptarea soiurilor de orez modificate genetic , opoziția față de culturile transgenice și reglementările privind acestea în unele țări, precum și distribuția eficientă a Orezului Auriu rămân unele dintre provocările în calea adoptării sale pe scară largă . Cu toate acestea, încurajați de eficacitatea soiului Orez Auriu 2 , cercetătorii lucrează acum la dezvoltarea de orez cu un conținut mai mare de fier și proteine .

Multe alte varietăți de culturi alimentare valoroase

(a)

(b)

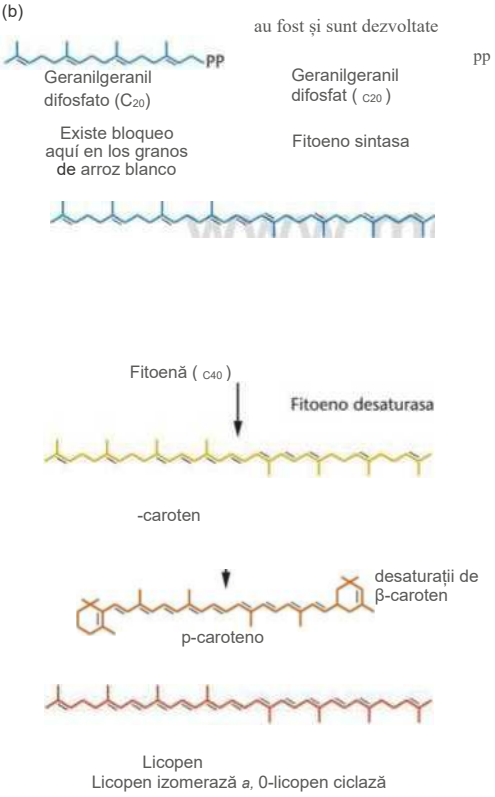


FIGURA 22.7 (a) Orez auriu, o varietate modificată genetic pentru a produce β-caroten, un precursor al vitaminei A. Mulți copii din țările în care orezul este un aliment de bază își pierd vederea din cauza deficitului de vitamina A. (b) Orezul alb nu conține enzima fitoen sintază, care este responsabilă de transformarea C20 in fitoenă, un pas responsabil pentru limitarea ratei de producție a β-carotenului. Introducerea genei fitoen sintază în orez este o modalitate de a ocoli această limitare *și* Pentru a produce orez auriu, îmbogățit cu β-caroten.

© 2005 Macmillan Publică-ți.

Culturile îmbunătățite nutrițional includ plante cu niveluri mai ridicate de acizi grași esențiali, antioxidanți și alte vitamine și minerale. Aceste eforturi vizează abordarea deficiențelor nutriționale care afectează peste 40 % din populația lumii. Alte evoluții anticipate includ ceaiurile și cafelele decofeinizate, precum și culturi cu trăsături îmbunătățite care afectează gustul, - ratele de creștere , productivitatea , culoarea, depozitarea , coacerea și alte caracteristici similare.

22.2 Rezumați pașii pentru transferul rezistenței la glifosat la o plantă de cultură . Credeți că această trăsătură genetică ar putea scăpa de la planta de cultură și ar putea face ca buruienile să devină rezistente la glifosat ? De ce?

AHORA RESUELVA ESTO

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care se dezvoltă culturile modificate genetic. Cheia rezolvării ei constă în luarea în considerare a metodelor prin care plantele se reproduc și a tipurilor de presiuni selective exercitate atât asupra plantelor sălbatice, cât și asupra culturilor domesticite.*

22.3

Animalele transgenice cu caracteristici îmbunătățite genetic pot juca un rol important în domeniul biotehnologiei

Deși plantele modificate genetic joacă un rol important în agricultura modernă, aplicațiile comerciale ale animalelor transgenice sunt mai puțin răspândite. Cu toate acestea, câteva exemple frapante de animale de fermă modificate genetic au stârnit interesul public și controverse considerabile.

Obținerea unui animal transgenic: elemente fundamentale

Metoda de creare a animalelor transgenice este relativ simplă din punct de vedere conceptual, deși sarcina se confruntă cu mai multe provocări specifice fiecărei specii. Multe dintre tehnicile predominante utilizate pentru crearea animalelor transgenice au fost dezvoltate folosind șoareci. O metodă implică izolarea ouălor recent fertilizate de la o femelă de șoarece (sau o femelă din specia animală dorită) și injectarea în nucleul ovulului a ADN-ului clonat și purificat care conține vectorul și transgena de interes (Figura 22.8). Într-un procent relativ mic de cazuri, ADN-ul rezultat nu este complet dezvoltat.

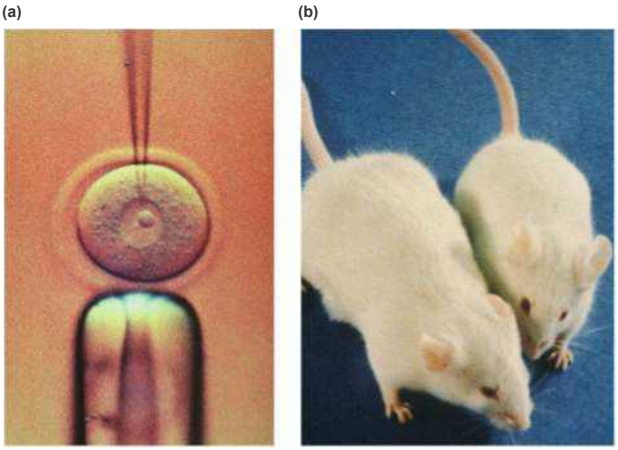


FIGURA 22.8 (a) Microinjecția ADN-ului clonat într-un ovul fertilizat. Injecțiile se efectuează prin manipularea ovulului și a acului de microinjecție sub microscop optic. Ovulul este ținut de o pipetă de aspirație (care poate fi văzută sub ovul).
(b) Un șoarece transgenic cu fratele său netransgenic. Șoarecele din stânga este transgenic pentru o genă a hormonului de creștere la șobolan, clonată în aval de un promotor de metalotioneină la șoarece. Când a fost ingerat zinc, creșterea șoarecelui transgenic a fost afectată.
ratón transgénico, el promotor de la metalotioneina inducía la transcripción del gen de la hormona del crecimiento, estimulando el

În celulele ovule transgenice mici, ADN-ul transgenic este inserat în genomul ovocitului prin recombinare, datorită acțiunii enzimelor naturale de recombinare a ADN-ului. Alte tehnici mai moderne, care implică utilizarea celulelor stem, sunt, de asemenea, destul de populare pentru crearea de animale transgenice.

Ouăle injectate sunt apoi plasate în oviductul a ceea ce se numește șoarece pseudogestante, o femelă care s-a împerecheat anterior cu un mascul steril. Șoarecele pseudogestante are un uter receptiv la implantarea ovulului care conține ADN-ul transgenic . Odată ce puii de șoarece se nasc, cercetătorii analizează care dintre aceștia sunt transgenici prin obținerea de ADN dintr-o probă de țesut cozii, purificarea ADN-ului și aplicarea PCR pentru a verifica dacă transgena este prezentă în genomul animalului. Atâta timp cât ADN-ul integrat este prezent în celulele germinale, transgena va fi moștenită de toți urmașii șoarecelui transgenic, deși este normal ca majoritatea șoarecilor transgenici din generația F produși în acest mod să nu fie homozigoți pentru transgenă. Împerecherile de frați din cadrul generației F pot fi apoi utilizate pentru a obține animale transgenice homozigote.

Printre exemplele de organisme transgenice care servesc drept - modele utile pentru cercetarea fundamentală și aplicată care vizează înțelegerea funcției genelor, avem animale transgenice care supraexprimă anumite gene, altele care exprimă gene umane și altele care exprimă gene mutante. Aici, ne vom concentra asupra câtorva exemple interesante de animale transgenice create cu scopul de a produce un produs biotehnologic potențial valoros din punct de vedere comercial.

Exemple de animale transgenice

Printre primele animale transgenice create s-au numărat șoareci mai mari decât în mod normal, care conțineau o transgenă pentru hormonul de creștere uman. Încercările de a crea animale de fermă care conțineau gene transgenice ale hormonului de creștere nu au avut prea mult succes, probabil pentru că creșterea este o trăsătură complexă, multigenică. O excepție notabilă este somonul comun transgenic , care poartă copii ale unei gene a hormonului de creștere de la somonul regal, adiacente unui promotor constitutiv. Acești somoni se maturizează rapid, cresc cu 400 până la 600 % mai repede decât somonii netransgenici, iar gena adăugată nu pare să provoace efecte adverse asupra sănătății (Figura 22.9).

După cum am văzut în Secțiunea 22.1, principala utilizare astăzi

a animalelor de fermă transgenice este ca bioreactoare pentru fabricarea de produse farmaceutice utile , dar sunt dezvoltate și alte aplicații.

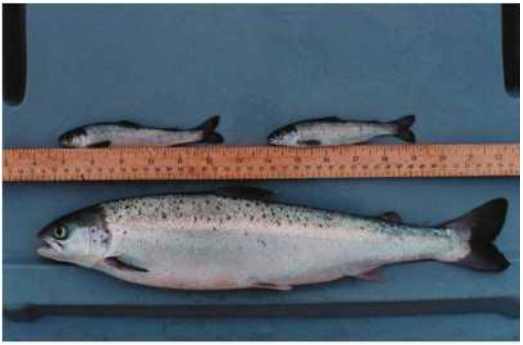
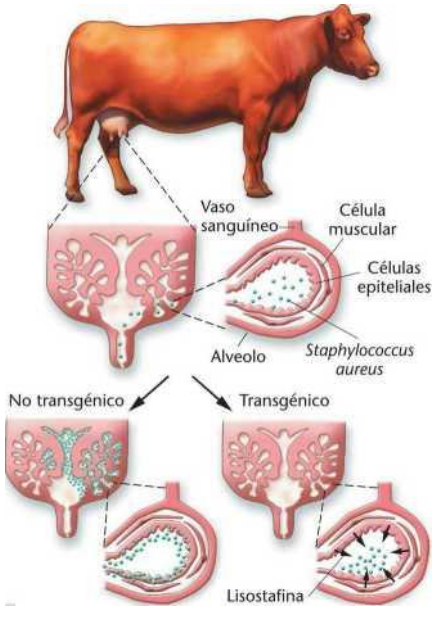


FIGURA 22.9 Somonul brun transgenic (mai jos), care supraexprimă o genă a hormonului de creștere, prezintă rate de creștere rapid accelerate în comparație cu varietățile sălbatice și netransgenice (mai sus). Somonul transgenic cântărește în medie de 10 ori mai mult decât varietățile netransgenice.

Există mai multe aplicații transgenice interesante. Unele dintre acestea sunt concepute pentru a crește producția de lapte sau valoarea nutritivă a laptelui. De asemenea, se depun eforturi semnificative de cercetare pentru a proteja animalele de fermă de agenții patogeni comuni care cauzează boli și pierderi de animale (inclusiv potențiale arme biologice care ar putea fi folosite într-un atac terorist împotriva animalelor pe care le mâncăm) și amenință aprovizionarea cu alimente. De exemplu, încercările de a controla mastita la bovine prin crearea de vaci transgenice (Figura 22.10) par promițătoare . Mastita este o infecție a glandelor mamare. Este cea mai costisitoare boală din industria lactatelor , cu pierderi estimate care depășesc 2 miliarde de dolari numai în Statele Unite. Mastita poate bloca canalele galactofore, poate reduce producția de lapte și poate contamina laptele cu microbi patogeni. Cea mai frecventă cauză a mastitei este infecția cu bacteria *Staphylococcus aureus,* iar majoritatea bovinelor cu mastită nu răspund bine la tratamentele convenționale cu antibiotice . Prin urmare, mastita este o cauză majoră a reducerii efectivelor de vaci.

Într-o încercare de a crea bovine rezistente la mastită, au fost create vaci transgenice care posedau gena lizostafinei de la *Staphylococcus sitnulans.* Lizostafina este o enzimă care scindează în mod specific componentele peretelui celular al S. *aureus.* Vacile transgenice care exprimă această proteină în laptele lor produc un antibiotic natural care...



© 2005 Macmillan Publishers Ltd.

FIGURA 22.10 Vaci transgenice pentru combaterea mastitei . Glandele mamare ale vacilor netransgenice sunt foarte susceptibile la infecția cu microbul cutanat *Staphylococcus aureus.* Vacile transgenice exprimă transgena lizostatinei în laptele lor , unde aceasta poate ucide *S. aureus.* înainte ca aceasta să se înmulțească suficient pentru a provoca inflamație și deteriorarea țesutului mamar.

Previne infecțiile cu S. aureus . Aceste vaci transgenice nu rezolvă complet problema mastitei, deoarece lizostatina nu este eficientă împotriva altor microbi, cum ar fi *E. coli* și S. *uberis* , care provoacă ocazional și mastită ; în plus, există și pericolul ca S. *aureus să* - dezvolte rezistență la lizostatină. Cu toate acestea, oamenii de știință sunt moderat optimiști că tehnicile transgenice sunt promițătoare pentru viitor în oferirea de animale de fermă o oarecare protecție împotriva principalilor agenți patogeni.

Recent, mai multe grupuri au produs bovine cărora le lipsește gena proteinei prionice *PrP.* Configurațiile greșit pliate ale proteinei PrP cauzează encefalopatia spongiformă bovină (ESB), cunoscută și sub numele de boala vacii nebune. Rezultatele inițiale indică faptul că aceste animale sunt rezistente la dezvoltarea ESB , deși nu se știe încă dacă sunt

complet protejate împotriva bolii. Un alt animal de fermă transgenic de succes este EnviroPig, un porc care exprimă gena care codifică enzima fitază. Acești porci sunt capabili să descompună fosforul alimentar , reducând astfel excreția de fosfor , care este un poluant major în fermele de porci.

Oamenii de știință de la Yorktown Industries din Austin, Texas, au creat GloFish, o varietate transgenică de pește zebră *(Danio rerio)* care conține o genă pentru o proteină fluorescentă roșie provenită de la anemonele de mare. Comercializat ca primul animal de companie transgenic din Statele Unite, GloFish prezintă o fluorescență roz aprins atunci când este iluminat cu lumină ultravioletă (Figura 22.11). Criticii modificării genetice spun că acești pești reprezintă un abuz al tehnologiei genetice. Cu toate acestea, GloFish s-ar putea să nu reprezinte o aplicație atât de frivolă a ingineriei genetice pe cât cred unii. O variantă a acestui model transgenic, care încorporează un promotor inductibil de metale grele adiacent genei proteinei fluorescente roșii , a arătat rezultate promițătoare într-un biotest legat de poluarea apei cu metale grele. Când acești pești zebră transgenici sunt plasați în apă contaminată cu mercur și alte metale grele, promotorul este activat , inducând transcripția genei pentru proteina fluorescentă roșie . În acest fel, fluorescența peștelui zebră poate fi utilizată ca biotest pentru a măsura contaminarea cu metale grele și absorbția acestor metale de către organismele vii.

22.4

Genomuri sintetice, transplant de genom și nașterea biologiei sintetice

Studiul genomurilor a condus la o întrebare fundamentală : „Care este numărul minim de gene necesare pentru a permite viața ?" Oamenii de știință sunt interesați de această întrebare în parte pentru că se așteaptă ca răspunsul să ofere modalități de a crea celule artificiale sau de a proiecta organisme pe baza genelor codificate de un genom sintetic, construit artificial . Putem folosi genomurile mici ale paraziților obligați pentru a specula asupra numărului minim de gene *necesar pentru a susține viața.* De exemplu, bacteria *Mycoplas ma genitalium,* Un agent patogen parazitar uman , * M . genitalium *, se găsește în cele mai simple procariote autoreplicante cunoscute și a servit drept model pentru înțelegerea elementelor minimale ale unui genom necesare pentru o celulă autoreplicantă. * *M. genitalium** are un genom de 580 kb. Acest parazit poate provoca boli la o gamă largă de gazde, inclusiv insecte , plante și oameni. La oameni , provoacă infecții genitale.

În 1995, o echipă din care au făcut parte J. Craig Venter , Hamilton Smith și Clyde Hutchison III a secvențiat genomul M. *genitalium* . Cu 485 de gene care codifică proteine, este unul dintre cele mai mici genomuri bacteriene care pot fi secvențiate. Prin contrast, genomul de 1,8 Mb al Haemophilus influenzae

FIGURA 22.11 GloFish, comercializado como la primera mascota genéticamente modificada del mundo, es uno de los productos controvertidos de la ingeniería genética.

(primul genom bacterian secvențiat) are 1.783 de *gene* . Disponibilitatea secvențelor genomice ne permite să ne întrebăm care subset din cele 485 de gene purtate de M. *genitalium* ar constitui un set minim de gene necesare vieții .

Putem defini viața în funcție de un număr specific de gene? O combinație de metode comparative și experimentale poate fi utilizată pentru a răspunde la această întrebare, inclusiv tehnici de genomică comparativă pentru a compara genomul **M. genitalium** cu cel al altor microorganisme înrudite, cum ar fi **M. pneumoniae** și **H. influenzae*. Prin compararea secvențelor nucleotidice ale genelor **M. genitalium** cu cele ale genelor **H. influenzae* ,* cercetătorii au identificat 240 de gene care sunt ortologe acestor specii. Pe lângă cele 240 de gene comune , au fost identificate 16 gene cu secvențe distincte, dar funcții identice. Acestea reprezintă funcții esențiale îndeplinite de gene non-ortologe. Prin urmare, genomica comparativă estimează că 256 de gene pot reprezenta setul minim de gene necesar pentru viață.

J. Craig Venter și colegii săi au folosit o tehnică experimentală pentru a determina câte dintre cele 480 de gene din *M. genitalium* sunt esențiale pentru viață . Aceștia au folosit metode bazate pe transpozoni pentru a muta selectiv genele din M. *genitalium.* Mutațiile genelor esențiale ar produce un fenotip letal, în timp ce mutațiile genelor neesențiale nu ar afecta viabilitatea și nu ar prezenta niciun impact negativ evident . Ei au stabilit că aproximativ 100 din cele 480 de gene erau neesențiale și că setul minim de gene al *M. genitalium* are aproximativ 381 de gene.

Un genom sintetic și un transplant genomic permit crearea unei tulpini bacteriene.

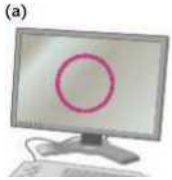
În 2008, oamenii de știință de la Institutul J. Craig Venter (JCVI) au publicat rezultatele unei sinteze chimice complete a genomului de 580 kb *de M. genitalium* , dar nu au reușit să demonstreze funcționalitatea genomului sintetic pe care îl produseseră, deoarece acesta nu putea fi transplantat într-o altă bacterie. Transplantul de genom este, în practică, adevărata demonstrație a funcționalității unui genom sintetic. Reamintim din Capitolul 20 că, dacă o plasmidă care conține o genă de interes este introdusă într-o bacterie , expresia genelor plasmidice va demonstra transformarea corectă a bacteriei, indiferent dacă acele gene sunt gene de rezistență la antibiotice sau o genă umană, cum ar fi insulina. Este esențial să se poată transplanta un genom sintetic complet și ca genele acelui genom sintetic să transforme complet fenotipul celulei .

oamenii de știință de la JCVI au publicat primul raport despre un genom sintetic funcțional. În această lucrare, au proiectat și sintetizat chimic peste 1.000 de segmente de câte 1.080 de perechi de baze , numite casete genetice , care acopereau întregul genom al *M. mycoides.* de 1,08 Mb [Figura 22.12(a)]. Pentru a asambla corect aceste segmente, secvențele aveau 80 de perechi de baze la fiecare capăt care se suprapuneau cu secvențele lor vecine. Aceste secvențe au fost clonate în *E. coli.* Apoi, folosind drojdia *Saccharomyces cerevisiae,* s-a utilizat o tehnică de recombinare omoloagă pentru a asambla secvențele în 11 segmente distincte de 10 kb , care au fost apoi combinate pentru a acoperi complet întregul genom de 1,08 Mb al *M. mycoides.* [Figura 22.12(b)].

Genomul complet asamblat, denumit JCVI-synl.0, a fost apoi transplantat într- o serie de celule receptoare de la o rudă apropiată, *M. capricolum, rezultând* o nouă celulă cu genotipul JCVI-synl.O și fenotipul unei noi tulpini de M. mycoides . JCVI - *synl.O* a fost introdus în genomul natural existent al *M. capricolum* (deși multe dintre detaliile mai mecanistice despre transplantul de genom sunt neclare). După cum se arată în Figura 22.12(c), JCVI a stabilit că celulele receptoare s-au diferențiat în *M. mycoides.* JCVI-synl.O, în parte pentru că au demonstrat că exprimă gena lacZ , care a fost încorporată în genomul sintetic [Figura 22.12(c)]. Selecția pentru rezistența *la* tetraciclină și determinarea faptului că celulele receptoare au produs și proteine caracteristice M. *mycoides* și nu *M. capricolum* . De asemenea, au fost folosite pentru a verifica conversia tulpinii.

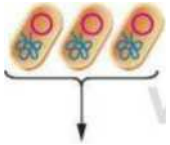
O realizare deosebit de impresionantă a acestor experimente a fost aceea că ADN-ul sintetic era ADN „nud", deoarece nu conținea nicio *proteină M. mycoides.* Prin urmare , după transplant, a fost capabilă să transcrie toate genele corespunzătoare și să traducă toate produsele proteice necesare vieții ca *M. mycoides.* Aceasta nu este o realizare banală. Genomul sintetic a reprogramat cu succes celulele *receptoare M. capricolum,* transformându-le într-un nou tip de celulă. Când a fost anunțată această lucrare , J. Craig Venter a declarat: „Acest lucru este echivalent cu înlocuirea unui Macintosh cu un PC prin simpla instalare a unui nou software PCI." Echipa JCVI lucrează în prezent la îndepărtarea segmentelor de 100 kb și la recombinarea lor pentru a determina ce segmente sunt necesare pentru a forma genomul minim necesar pentru a crea o tulpină de *M. mycoides.*

Venter și alți cercetători au folosit tehnologia ADN-ului recombinant pentru a construi copii sintetice ale genomurilor virale . Această tehnică a demonstrat că un genom minimal poate fi creat și asamblat pentru organisme nevii, cum ar fi virusurile. De exemplu, a fost posibil...



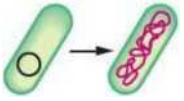
Proiectarea genomului *M. mycoides*

Sinteza chimică a 1.078 casete de oligonucleotide a câte 1.080 perechi de baze care acoperă întregul genom de 1,8 Mb al *M. mycoides*



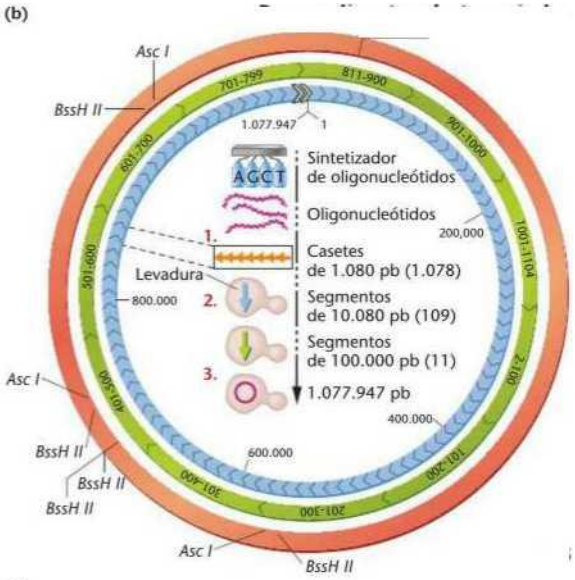
Casete de clonare în E. *colt*

Asamblarea întregului genom în 5. *cerevisiae*



Transplant de genom la *M. capricolum*

© 2010 Macmillan Publishers Ltd.



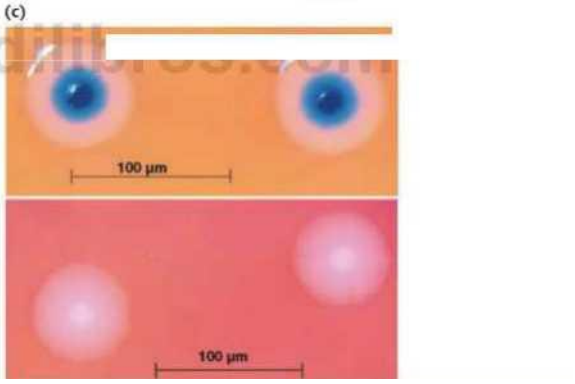


FIGURA 22.12 Construcția unei versiuni sintetice a genomului JCVI-syn1.0 de 1,08 Mb al *Mycoplasma mycoides*. (a) Rezumatul tehnicii utilizate pentru producerea JCVI-syn1.0 din *M. mycoides*. (b) Asamblarea la drojdie a genomului sintetic M. mycoides a fost *efectuată* în trei etape: (1) 1.080 de segmente de perechi de baze (casete) au fost create din oligonucleotide sintetice suprapuse (săgeți portocalii), (2) segmentele au fost recombinate în seturi de 10 pentru a obține segmente de 10^9 ~10 kb (săgeți albastre) și (3) aceste segmente au fost combinate în seturi de 10 pentru a obține segmente de 11 ~ 100 kb (săgeți verzi). Asamblarea a fost efectuată la drojdie pentru a crea genomul sintetic complet denumit JCVI-syn1.0. (c) Imagini cu *M. mycoides JCVI* -syn1.0 (sus) și M. *mycoides* Celule de tip sălbatic (jos). Celulele cu genom sintetic exprimă gena *lacZ și, prin urmare* , sunt albastre , în timp ce celulele de tip sălbatic nu exprimă gena *lacZ* . și sunt albe.

să asambleze în acest fel genomul virusului poliomielitei și cel al tulpinii gripale responsabile de epidemia din 1918. Însă munca recentă a lui Venter cu *M. mycoides JC-Vlsynl.O 9, un proiect* de un deceniu care a costat aproximativ 40 de milioane de dolari și a implicat aproximativ 20 de persoane, este aclamată ca unul dintre evenimentele cheie din domeniul emergent al biologiei sintetice.

Acest proiect nu a creat viață dintr-un obiect neînsuflețit , deoarece accentul său a fost pus pe convertirea unei tulpini vii în alta. În plus, tulpinile *de micoplasma* utilizate nu aveau peretele celular întâlnit în mod obișnuit la alte bacterii, ceea ce ar fi o barieră în calea transplantului de genom la acele alte specii bacteriene . Multe întrebări fundamentale despre genomurile sintetice și transplantul de genom rămân fără răspuns , dar aceste studii au oferit în mod clar „dovada conceptului " cheie , demonstrând că genomurile sintetice pot fi produse, asamblate și transplantate cu succes pentru a crea o tulpină microbiană codificată de acel genom sintetic. Acest lucru îi apropie pe oamenii de știință de obiectivul de a produce genomuri sintetice complet noi, care încorporează gene pentru o serie de trăsături specifice de interes.

Ce aplicații potențiale au genomurile sintetice și biologia sintetică? JCVI afirmă că scopul său final este de a crea microorganisme care pot fi utilizate pentru sintetizarea biocombustibililor. Există și alte posibilități, cum ar fi crearea de microbi sintetici cu genomuri modificate care exprimă produse genetice ce degradează poluanții (bioremediere); sintetizarea de noi produse biofarmaceutice; obținerea de bacterii programate genetic care ajută la vindecarea bolilor ; și capacitatea de a fabrica „proteze genomice". Cercetările privind genomurile sintetice și biologia sintetică au condus la speculații despre o lume viitoare în care putem proiecta noi bacterii și poate noi celule animale și vegetale și chiar să le programăm pentru a fi controlate în orice mod dorim . Ar putea fi folosite genomurile sintetice în viitor pentru a crea viață din componente neînsuflețite ? Rămâneți pe față!

22,5 Ingineria genetică și genomica transformă diagnosticul medical

Astăzi , geneticienii aplică cunoștințele despre genomul uman și baza genetică a multor boli într -o gamă largă de aplicații medicale. Tehnologiile bazate pe gene au deja un impact major asupra diagnosticării bolilor și revoluționează tratamentele medicale și dezvoltarea de medicamente eficiente și specifice . Datorită în mare parte Proiectului Genomului Uman, cercetătorii identifică genele implicate atât în bolile monogenice, cât și în trăsăturile genetice complexe . Toate acestea sunt posibile prin metode bazate pe ADN recombinant și tehnologii genomice . În această secțiune, vom oferi o prezentare generală a mai multor exemple reprezentative care demonstrează modul în care tehnologiile bazate pe gene sunt utilizate pentru diagnosticarea bolilor genetice .

Folosind teste bazate pe ADN, oamenii de știință pot examina direct ADN-ul unui pacient pentru mutații asociate cu boli . Testarea genetică a fost una dintre primele aplicații de succes ale tehnologiei ADN-ului recombinant, iar în prezent sunt utilizate peste 900 de teste genetice. Aceste teste detectează de obicei mutațiile ADN asociate cu tulburări monogenice care sunt moștenite în mod mendelian . Exemple de astfel de teste genetice includ cele care detectează anemia falciformă, fibroza chistică, boala Huntington , hemofilia și distrofiile musculare. Alte teste genetice au fost dezvoltate pentru tulburări complexe , cum ar fi cancerul de sân și de colon. Testarea genetică este utilizată pentru diagnosticul prenatal al bolilor genetice, pentru a identifica purtătorii, pentru a prezice dezvoltarea viitoare a bolii la adulți, pentru a confirma diagnosticul unei boli detectate prin alte metode și pentru a identifica bolile genetice la embrionii creați prin fertilizare *in vitro* .

Pentru testarea genetică a adulților, se utilizează de obicei ADN-ul din leucocite . Alternativ, multe teste genetice pot fi efectuate utilizând celule din interiorul obrazului , obținute prin tamponare bucală, sau celule ciliate. Unele teste genetice pot fi efectuate utilizând gameți . Pentru diagnosticul prenatal , celulele fetale sunt obținute prin amniocenteză sau prelevare de vilozități coriale (CVS). Figura 22.13 prezintă procedura utilizată în amniocenteză , în care se prelevează un volum mic de lichid amniotic care înconjoară fătul . Lichidul amniotic conține celule fetale care pot fi utilizate pentru cariotipare , testare genetică și alte tipuri de teste. Pentru CVS , se utilizează un tub vidat pentru a preleva celule din partea fetală a peretelui placentar (vilozitățile coriale), iar acest țesut poate fi analizat .

O altă tehnică, numită selecție a celulelor fetale, ar putea înlocui în cele din urmă amniocenteza și prelevarea de vilozități coriale , deoarece este neinvazivă pentru făt. La femeile însărcinate , sângele matern conține un număr mic de celule fetale. Un instrument numit sortator de celule activat prin fluorescență poate fi utilizat pentru a separa celulele fetale dintr -o probă de sânge matern , pe baza proteinelor exprimate în celulele fetale , dar nu și în celulele materne .

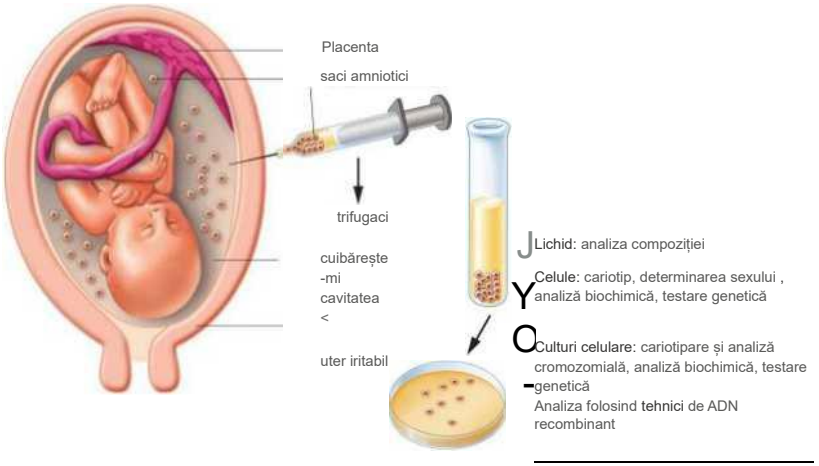


FIGURA 22.13 Pentru amniocenteză, poziția fătului este mai întâi determinată prin ecografie, apoi se introduce un ac prin pereții abdominali *și* uterini, pentru a extrage lichid amniotic și celule fetale, pentru analize genetice și biochimice.

Probele fetale prelevate pot fi apoi supuse analizei genetice, de obicei folosind tehnici bazate pe PCR (cum ar fi testele de oligonucleotide specifice alelelor descrise mai târziu în această secțiune).

Teste genetice bazate pe analiza enzimelor de restricție

O metodă clasică de testare genetică este analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (RFLP). După cum vom vedea în secțiunea următoare , metodele bazate pe PCR au înlocuit în mare măsură analiza RFLP; cu toate acestea, această tehnică este încă utilizată ocazional și este util să se compare, în scopuri istorice, analiza RFLP cu tehnici mai noi, care nu erau la fel de răspândite înainte de finalizarea Proiectului Genomului Uman. Pentru a ilustra această metodă, vom examina diagnosticul prenatal al anemiei falciforme . După cum am explicat deja, această boală este o tulburare autosomal recesivă, frecventă la persoanele ale căror origini familiale se află în Africa de Vest, bazinul mediteranean și în părți din Orientul Mijlociu și India. Boala este cauzată de substituția unui singur aminoacid în proteina β-globinei, ca o consecință a unei substituții a unui singur nucleotid în gena β-globinei. Substituția unui singur nucleotid elimină, de asemenea, un situs de restricție pentru enzimele Ms til și Cvnl din gena β-globinei. Drept urmare, mutația modifică modelul fragmentelor de restricție detectate în testele de hibridizare Southern . Aceste diferențe în situsurile de restricție ale enzimelor de restricție sunt utilizate pentru diagnosticul prenatal al anemiei falciforme și pentru a stabili genotipurile părinților și ale altor membri ai familiei care pot fi purtători heterozigoți ai acestei tulburări.

ADN-ul este extras din probele de țesut și digerat cu AfsII. Această enzimă taie de trei ori într -o regiune a genei normale β-globinei , producând două fragmente mici de ADN. În alela anemiei falciforme , situsul central al MstII este distrus de mutație , astfel încât digestia cu AfstII produce un fragment de restricție mai mare (Figura 22.14). Fragmentele de ADN digerate cu enzima de restricție sunt separate prin electroforeză pe gel, transferate pe o membrană de nailon și vizualizate prin hibridizare Southern blot folosind o sondă pentru această regiune . Figura 22.14 prezintă rezultatele analizei RFLP pentru anemia falciformă într -o familie . Ambii părinți (1-1 și 1-2) sunt purtători heterozigoți ai mutației. Digestia cu MstII a ADN-ului parental produce o bandă mare (datorată alelei mutante) și două benzi mai mici (de la alela normală) în ambele cazuri. Primul copil al cuplului (II- 1) este homozigot normal deoarece are doar cele două benzi mai mici . Al doilea copil (II-2) are anemie falciformă ; El are o singură bandă mare și este

homozigot pentru alela mutantă .

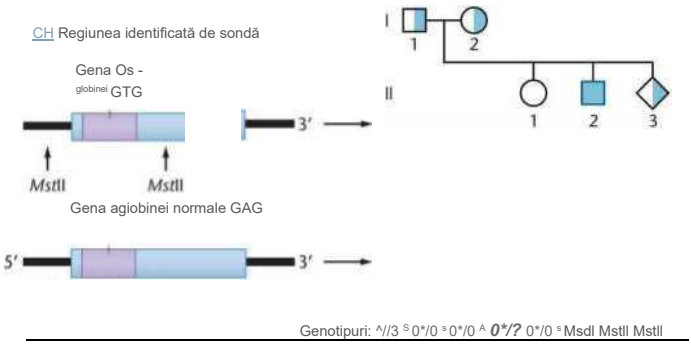
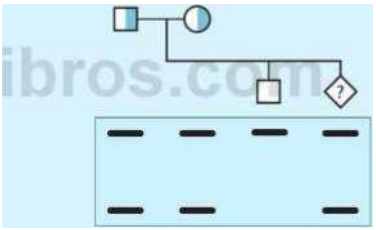


FIGURA 22.14 Diagnosticul anemiei falciforme prin RFLP. În alela mutantă a β-globinei (^{βes}), o mutație punctuală (GAG - βGTG) a distrus un situs de clivaj al enzimei de restricție Mst1 , rezultând un singur fragment mare la hibridizarea Southern blot. Analiza genealogică arată că familia are o fiică normală homozigotă neafectată (II-1), un fiu afectat (II-2) și un făt purtător neafectat (II-3). Genotipul fiecărui membru al familiei poate fi citit direct din hibridizare și este prezentat sub fiecare bandă.

mutant. Fătul (11-3) are o bandă mare și două benzi mici și, prin urmare, este heterozigot pentru anemia falciformă. Nu va fi afectat de boală, dar va fi purtător.

Doar 5 până la 10% din totalul mutațiilor punctuale pot fi detectate prin analiza enzimelor de restricție, deoarece majoritatea mutațiilor apar în regiuni ale genomului care nu conțin situsuri de tăiere a enzimelor de restricție. Cu toate acestea, acum că Proiectul Genomului Uman este finalizat și se cunosc multe mutații asociate bolilor, geneticienii pot utiliza oligonucleotide sintetice pentru a detecta aceste mutații, așa cum este descris mai jos.



■ **SUGESTIE:** *Această problemă implică interpretarea rezultatelor analizei RFLP a unui făt. Cheia rezolvării acesteia este să ne amintim că diferențele în numărul și poziția situsurilor de restricție creează polimorfisme RFLP care pot fi utilizate pentru a determina genotipul.*

ACUM REZOLVĂ ASTA

22.3 Ni se solicită să ajutăm la efectuarea testelor genetice prenatale pentru un cuplu. Ambii sunt purtători ai unei deleții în gena β-globinei, care provoacă β-talasemie la purtătorii homozigoți. Cuplul are deja un copil care nu este afectat de boală și nu este purtător . Femeia este însărcinată , iar cuplul dorește să afle starea fătului . Primim probe de ADN fetal obținute prin amniocenteză și probe de la restul familiei obținute prin prelevare de leucocite . Folosind o sondă care se leagă de alela mutantă, obținem următorul rezultat într-un test de hibridizare . Este fătul afectat? Care este genotipul său pentru gena β-globinei?

Teste genetice utilizând oligonucleotide specifice alelelor

O altă metodă de testare genetică implică utilizarea unor sonde de ADN sintetice cunoscute sub numele de oligonucleotide specifice alelelor (ASO). Oamenii de știință folosesc aceste fragmente scurte de ADN monocatenar pentru a identifica alele care diferă chiar și cu un singur nucleotid. Spre deosebire de analiza enzimelor de restricție, care este limitată la cazurile în care o mutație modifică un situs de restricție, ASO detectează modificări ale unui singur nucleotid (polimorfisme cu un singur nucleotid sau SNP -uri), inclusiv pe cele care nu afectează situsurile de tăiere ale enzimelor de restricție. Prin urmare, această

metodă oferă o rezoluție mai mare și o aplicare mai largă. În condiții adecvate, un ASO se va hibridiza doar cu secvența sa complementară de ADN și nu cu alte secvențe, chiar și cu cele care diferă cu un singur nucleotid.

Testele genetice care utilizează ASO și analiza PCR sunt acum disponibile pentru a detecta numeroase boli, inclusiv anemia falciformă. În cazul detectării anemiei falciforme, se extrage ADN-ul și o regiune a genei β-globinei este amplificată prin PCR. O cantitate mică de ADN amplificat este depusă pe benzile unei membrane de legare a ADN-ului , fiecare bandă fiind hibridizată cu un ASO sintetizat pentru a semăna cu secvența relevantă a unei gene β-globinei mutante sau normale (Figura 22.15). ASO este marcat cu o moleculă care poate fi radioactivă sau fluorescentă, permițând vizualizarea ASO hibridizat cu ADN-ul de pe membrană. Această tehnică rapidă, ieftină și extrem de precisă este utilizată pentru a diagnostica o gamă largă de tulburări genetice cauzate de mutații punctuale. Deși extrem de eficiente, SNP-urile pot afecta legarea sondei, producând rezultate fals pozitive sau fals negative care pot să nu reflecte o tulburare genetică, mai ales dacă nu se utilizează condiții de hibridizare foarte precise. Uneori, secvențierea ADN-ului este efectuată folosind segmente genetice amplificate pentru a confirma identificarea unei mutații.

testele ASO utilizează PCR , pot fi analizate cantități mici de ADN. Prin urmare , testele ASO sunt ideale pentru diagnosticul genetic preimplantațional (PGD). PGD este analiza genetică a celulelor provenite din embrioni creați prin fertilizare *in vitro* . (Figura 22.16). Când spermatozoizii și ovulele sunt amestecate pentru a produce zigoți, embrionii sunt cultivați în culturi în primele etape ale dezvoltării. O singură celulă poate fi extrasă dintr-un embrion aflat în stadiu incipient folosind o pipetă cu vid pentru a aspira ușor o celulă din embrion (Figura 22.16). Aceasta ar putea ucide embrionul , dar dacă se face corect, acesta va continua adesea să se divizeze normal. ADN-ul din celula extrasă este apoi analizat de obicei folosind FISH (pentru analiza cromozomilor) sau testul ASO (Figura 22.16). Genotipurile fiecărei celule pot fi apoi utilizate pentru a decide ce embrioni vor fi implantați în uter. Orice alelă detectabilă prin testul ASO poate fi utilizată pentru testarea DGP. DGP este adesea utilizat pentru screening-ul pentru anemia falciformă, fibroza chistică și nanism , dar alelele pentru multe alte tulburări sunt, de asemenea, testate în mod obișnuit .

ASO-urile pot fi, de asemenea, utilizate pentru a detecta tulburări care implică deleții mai degrabă decât mutații ale

Regiunea amplificată prin PCR a genei γ-globinei

Codonul 6

5′ 3′

■ Regiunea acoperită de sondele ASO

ADN-ul este depus pe filtre de legare și hibridizat cu sonda ASO

(a) Genotipuri *AA AS SS*

• *O O*

ASO normal (0 ^{A}): 5' - CTCCTGAGGAGAAGTCTGC - 3'

(b) Genotipuri *AA AS 55*

DA •

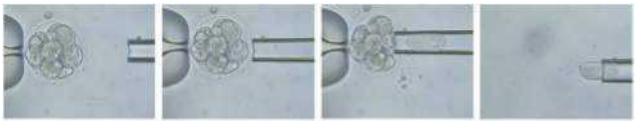
Mutant ASO (£ ^{s}): 5' - CTCCTGTGGAGAAGTCTGC - 3'

FIGURA 22.15 Testul oligonucleotidelor specifice alelelor (ASO) pentru gena β-globinei și anemia falciformă. Gena β- globinei este amplificată prin PCR utilizând ADN extras din leucocite sau celule obținute prin amniocenteză. ADN-ul amplificat este apoi denaturat și depus pe benzile membranei de legare a ADN-ului . Fiecare bandă este hibridizată cu un ASO specific și vizualizată pe film cu raze X după hibridizare și developare.

(a) Rezultate observate atunci când cele trei genotipuri posibile sunt hibridizate cu o sondă ASO a alelei normale a β-globinei: indivizii homozigoți AA au hemoglobină normală cu două copii ale genei normale a β-globinei și vor prezenta o oarecare hibridizare; indivizii heterozigoți AS poartă o alelă normală a β - globinei *și* o alelă mutantă și vor prezenta o hibridizare mai slabă ; indivizii homozigoți 55 pentru alela anemiei falciforme nu poartă nicio copie normală a genei β - globinei , deci nu vor prezenta nicio hibridizare cu sonda ASO a alelei normale a β - globinei .

(b) Rezultatele observate atunci când ADN-ul din cele trei genotipuri este hibridizat cu sonda corespunzătoare alelei /f - globinei din anemia falciformă : nu există hibridizare cu genotipul *AA* , există o hibridizare slabă cu heterozigotul (A5) și există o hibridizare puternică cu genotipul homozigot pentru anemia falciformă (55).

un singur nucleotid. Un exemplu ar fi utilizarea ASO pentru diagnosticarea fibrozei chistice. Fibroza chistică este o tulburare autosomal recesivă asociată cu un defect al unei proteine numite regulatorul conductanței transmembranare a fibrozei chistice (CFTR), care reglează transportul ionilor de clorură prin membrana plasmatică. Șaptezeci la sută din toate copiile mutante ale genei *CFTR* conțin o mică deleție numită A508. Pentru a detecta purtătorii mutației A508, ASO-urile sunt fabricate prin PCR din probe clonate ale alelelor normale și mutante. ADN-ul extras din



În stadiul de 8-16 celule, o singură celulă este extrasă ușor dintr-un embrion folosind o pipetă de aspirație. Celulele rămase continuă să crească în cultură.

Yo

ADN-ul dintr-o celulă izolată este amplificat prin PCR folosind primeri pentru gena O-globinei.
Volume mici de produse PCR denaturate sunt depuse pe două membrane separate care leagă ADN-ul.

O membrană este hibridizată cu o sondă pentru alela normală a O-globinei (OA), iar cealaltă membrană este hibridizată cu o sondă pentru alela mutantă a O-globinei (fi3).

mergeți la •

Membrană hibridizată cu o sondă pentru alela
0 -globină normală (fi*) alela 0-globină mutantă (/?)

În acest exemplu, hibridizarea produselor PCR cu Sondele corespunzătoare ambelor alele fi* și 0S dezvăluie că celula analizată prin PGD are un genotip purtător (fi*fi 3) pentru anemia falciformă.

FIGURA 22.16 O singură celulă poate fi extrasă dintr-un embrion uman aflat în stadiu incipient, creat prin fertilizare *in vitro* , și supusă diagnosticului genetic preimplantațional (PGD) utilizând teste ASO. ADN-ul este izolat din celulă, amplificat prin PCR cu primeri specifici genei de interes și apoi supus analizei ASO, așa cum se arată în Figura 22.15 . În acest exemplu, o regiune a genei β-globinei a fost amplificată și analizată utilizând teste ASO pentru a determina genotipul de anemie falciformă al acestei celule.

Leucocitele de la indivizii pe care dorim să îi analizăm sunt amplificate prin PCR și apoi hibridizate cu fiecare ASO (Figura 22.17). La indivizii afectați, hibridizează doar ASO-ul corespunzător alelei mutante. La heterozigoți , ambele ASO-uri hibridizează, iar la homozigoții normali, hibridizează doar ASO-ul corespunzător alelei normale.

Fibroza chistică afectează aproximativ 1 din 2.000 de persoane de origine nord-europeană. Tehnicile de screening pentru fibroza chistică pot fi utilizate în aceste populații pentru a identifica purtătorii și a-i consilia cu privire la statutul lor genetic pentru această boală. Cu toate acestea, geneticienii au dovezi ale a peste 1.000 de mutații diferite în această genă. Nu toate aceste alele pot fi detectate deoarece testele ASO nu au fost dezvoltate pentru toate aceste variante. Rețineți, de asemenea, că un test ASO poate detecta doar alelele specifice pentru care este conceput testul. Prin urmare, un rezultat negativ nu exclude neapărat posibilitatea ca cineva să aibă alte alele mutante pentru o anumită boală. În plus, este probabil ca alte mutații ale fibrozei chistice să nu fie încă identificate . În consecință ,

Screening-urile pentru fibroza chistică nu sunt disponibile pe scară largă , deși vor deveni, fără îndoială, obișnuite imediat ce testele vor putea detecta majoritatea mutațiilor posibile.

ACUM REZOLVĂ ASTA

22.4 Secvența de ADN care înconjoară situsul de mutație corespunzător anemiei falciforme din gena λ - globinei , pentru gena normală și mutantă , este următoarea .

Fiecare tip de ADN este denaturat pentru a obține catene simple și aplicat pe o membrană de legare a ADN - ului. Membrana , care conține două situsuri de depunere , este hibridizată cu un ASO care are secvența

5 '-GACTCCTGAGGAGAAGT-3 '

Care dintre puncte se va hibridiza cu această sondă, dacă există vreuna ?

5'-GACTCCTGAGGAGAAGT-3'

y-CTGACGACTCCTCTTCA- 5'

ADN normal
5'-GACTCCTGTGGAGAAGT-3'

y-CTGAGGACACCTTCA- 5'
Anemia falciformă a ADN-ului

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să analizăm rezultatele unui test ASO. Cheia rezolvării acesteia este înțelegerea faptului că testul ASO este efectuat într-o serie de condiții care asigură că doar secvențe de nucleotide identice se pot hibridiza cu ASO conținut în membrană.*

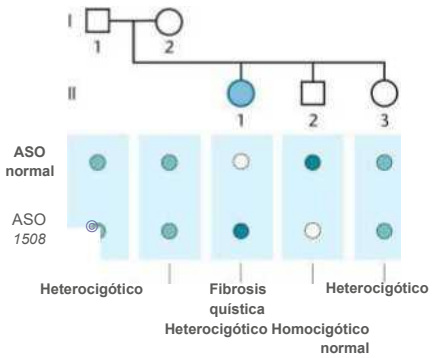
Testarea genetică folosind cipuri ADN și trasarea genomică

Testele RFLP, precum ASO, sunt metode eficiente pentru detectarea mutațiilor genetice; cu toate acestea, acestea pot detecta doar prezența uneia sau câtorva mutații specifice a căror identitate și poziții în gene sunt cunoscute. De asemenea, sunt necesare teste genetice care pot detecta modele complexe de mutații sau mutații necunoscute anterior în genele asociate cu boli genetice și cancere. De exemplu, gena responsabilă de fibroza chistică (gena *CFTR)* conține 27 de exoni și se întinde pe aproximativ 250 de kilobaze de ADN genomic. Așa cum am menționat anterior, dintre cele 1.000 de mutații cunoscute în *gena CFTR,* aproximativ jumătate sunt mutații punctuale , inserții și deleții - iar acestea sunt distribuite pe scară largă în întreaga genă . În plus, este posibil să mai fie descoperite mutații *CFTR* suplimentare .

ASO pentru secvența de ADN regiunea mutației *Σ508* în fibroza chistică

5 -CACCAAACATC ATATTTTC-3
Regiunea ștearsă
în *S508*

ASO para la secuencia de ADN mutante en la región 5-CACCAATGATATTTTC-3' alrededor de la deleción *1508*



ASO-urile de pe membrane . Genotipul fiecărui membru al familiei poate fi apoi citit direct de pe membrane . ADN - ul părinților (1-1 și I-2) hibridizează cu ambele ASO-uri, indicând faptul că ambele au o alelă normală și o alelă mutantă și , prin urmare , sunt heterozigote. ADN-ul lui 11-1 hibridizează doar cu ASO 1508 . Aceasta indică faptul că acest membru al familiei este homozigot pentru mutație și are fibroză chistică. ADN -ul de la 11-2 hibridizează doar cu ASO alelei normale de fibroză chistică , ceea ce indică faptul că acest individ poartă două alele normale . ADN-ul de la 11-3 prezintă două situsuri de hibridizare, deci persoana este heterozigotă și purtătoare de fibroză chistică .

În mod similar , se cunosc peste 500 de mutații distincte în cadrul genei supresoare tumorale *p53* , iar oricare dintre aceste mutații poate fi asociată cu diverse tipuri de cancer sau poate predispune un pacient la acestea. Detectarea mutațiilor în aceste gene necesită metode complete , de mare randament.

Reamintim din Capitolul 21 că o tehnică emergentă de detectare cu randament ridicat se bazează pe utilizarea cipurilor ADN. Cipurile ADN (numite și cipuri genetice) sunt suporturi mici, solide , de obicei fabricate din sticlă sau cuarț șlefuit, pe care sunt depuse fragmente cunoscute

FIGURA 22.17 Detectarea unei deleții a genei CFTR utilizând teste ASO. Testele ASO pentru regiunea care cuprinde cea mai frecventă mutație a fibrozei chistice (*alela 1508)* sunt preparate din copii clonate ale alelei normale și ale ***alelei*** 1508 . conținând o mică deleție și sunt depuse pe membranele de legare a ADN-ului . Pentru screening, alelele de fibroză chistică sunt amplificate prin PCR, marcate și hibridizate cu

de ADN într-un model precis. Fiecare punct de pe un cip ADN se numește câmp. Fragmentele de ADN depuse într-un câmp al unui cip ADN - numite sonde - sunt monocatenare și pot fi oligonucleotide sintetizate *in vitro* sau fragmente de ADN mai lungi create prin clonare sau amplificare PCR. De obicei, există mai mult de un milion de molecule de ADN identice în fiecare câmp. Numărul și tipurile de secvențe de ADN de pe un cip sunt dictate de tipul de analiză necesar. De exemplu, fiecare câmp al unui cip ar putea conține o secvență de ADN derivată din fiecare membru al unei familii de gene, variante de secvență ale uneia sau mai multor gene de interes sau o secvență derivată din fiecare genă din genomul unui organism. Unele cipuri ADN utilizează secvențe sondă identice în fiecare câmp pentru o anumită genă; alte cipuri ADN utilizează multe sonde diferite pentru aceeași genă. Ceea ce face ca cipurile ADN să fie atât de extraordinare este cantitatea imensă de informații care pot fi generate simultan de pe un singur cip. Cipurile ADN de dimensiunea unui timbru poștal (aproximativ 1 cm²) pot conține până la 500.000 de câmpuri distincte, fiecare reprezentând o secvență de ADN diferită. În Capitolul 21, am văzut cum au fost utilizate cipurile ADN pentru analiza transcripțională. Oamenii de știință utilizează acum cipuri ADN într-o gamă largă de aplicații, inclusiv detectarea mutațiilor în ADN-ul genomic și detectarea modelelor de expresie genică în țesuturile bolnave.

Majoritatea genelor umane sunt disponibile pe un cip al genomului uman (Figura 22.18). Geneticienii

FIGURA 22.18 Un cip ADN disponibil comercial, numit GeneChip, comercializat de Asymetrix, Inc. Acest cip poate fi utilizat pentru a analiza expresia a aproximativ 50.000 de transcrieri de ARN . Conține 22 de sonde diferite pentru fiecare transcript *și* permite oamenilor de știință să evalueze simultan nivelurile de expresie ale majorității genelor din genomul uman. Un cip ADN cunoscut sub numele de cip de genotipare este adesea utilizat pentru a detecta mutații în gene specifice. Sondele dintr-un cip de genotipare sunt compuse din oligonucleotide scurte, lungi de aproximativ 20 de nucleotide. Aceste sonde sunt concepute pentru a scana metodic gena de interes, câte un nucleotid pe rând, verificând prezența unei mutații la fiecare poziție din genă. Fiecare poziție a genei este verificată prin intermediul unui set de cinci oligonucleotide (și, prin urmare, cinci câmpuri aranjate într-o coloană) care sunt identice ca secvență, cu excepția faptului că există un nucleotid care diferă în fiecare dintre ele , care poate fi A, C, G, T sau o deleție (Figura 22.19).

Proba de ADN genomic care urmează să fie testată cu acest cip ADN este tăiată în fragmente mici , iar regiunile de ADN de interes sunt amplificate prin PCR, marcate cu un colorant fluorescent și apoi hibridizate la cip. Moleculele de ADN cu o secvență care corespunde exact secvenței prezente într-un câmp de pe cip se vor hibridiza la acel câmp. Moleculele de ADN care diferă prin unul sau mai multe nucleotide se vor hibridiza mai puțin eficient sau deloc, în funcție de condițiile de hibridizare . După spălarea materialului care nu s-a hibridizat la cip, oamenii de știință analizează cipul cu un scaner de fluorescență pentru a determina care câmpuri s-au hibridizat la proba de ADN testată și care câmpuri nu .

În condiții riguroase de hibridizare , fragmentul de ADN amplificat prin PCR se va hibridiza cel mai eficient cu complementul său exact, dar mult mai puțin eficient cu alte variante ale secvenței . Prin urmare, cea mai puternică hibridizare dintre cele cinci câmpuri va fi cu sonda oligonucleotidică care conține nucleotida corectă în poziția de testare. Secvența de ADN testată poate fi astfel determinată prin citirea coloanelor și notarea câmpurilor în care hibridizarea este cea mai puternică (Figura 22.20). Cipurile ADN au fost concepute pentru a scana mutații în multe gene legate de boli , inclusiv *gena p53,* care este mutată în majoritatea cancerelor umane , și *gena BRCA1,* care, atunci când este mutată, predispune femeile la cancerul de sân. Figura 22.20 prezintă rezultatele unui cip de genotipare pentru gena p53 . În acest exemplu, hibridizarea fragmentelor de ADN amplificate prin PCR obținute de la un pacient apare ca puncte verzi sau albastru-verzui pe cip [Figura 22.20(b)]. Interpretarea modelului de hibridizare dezvăluie secvența genei *P53* . al pacientului („țintă").

Pe lângă verificarea mutațiilor în gene individuale, cipurile ADN pot conține sonde care detectează polimorfismele SNP. SNP-urile apar aleatoriu la fiecare 100 până la 300 de nucleotide în întregul ADN.

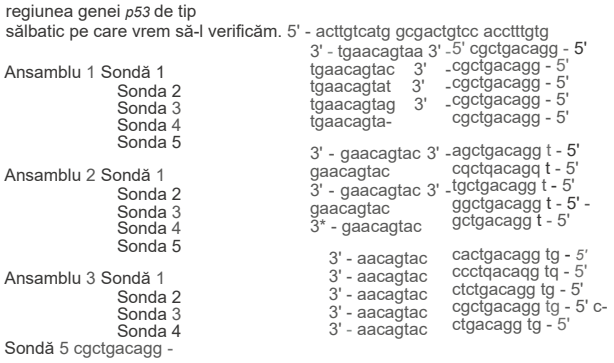

regiunea genei p53 de tip
sălbatic pe care vrem să-l verificăm. 5' - acttgtcatg gcgactgtcc acctttgtg
3' - tgaacagtaa 3' - 5' cgctgacagg - 5'
Ansamblu 1 Sondă 1
tgaacagtac 3' - cgctgacagg - 5'
Sonda 2
tgaacagtat 3' - cgctgacagg - 5'
Sonda 3
tgaacagtag 3' - cgctgacagg - 5'
Sonda 4
tgaacagta- cgctgacagg - 5'
Sonda 5
3' - gaacagtac 3' - agctgacagg t - 5'
Ansamblu 2 Sondă 1
gaacagtac cqctqacagq t - 5'
Sonda 2
3' - gaacagtac 3' - tgctgacagg t - 5'
Sonda 3
gaacagtac ggctgacagg t - 5' -
Sonda 4
3* - gaacagtac gctgacagg t - 5'
Sonda 5
3' - aacagtac cactgacagg tg - 5'
Ansamblu 3 Sondă 1
3' - aacagtac ccctqacaqg tq - 5'
Sonda 2
3' - aacagtac ctctgacagg tg - 5'
Sonda 3
3' - aacagtac cgctgacagg tg - 5' c-
Sonda 4
3' - aacagtac ctgacagg tg - 5'
Sondă 5 cgctgacagg -

FIGURA 22.19 Exemplu de sondă oligonucleotidică concepută pentru utilizare pe un cip ADN pentru genotipare. Fiecare sondă ar ocupa un câmp diferit pe cip. Fiecare set de cinci sonde este aliniat sub poziția nucleotidului care urmează să fie testat (evidențiat cu albastru). Sondele din fiecare set sunt complet identice, cu excepția faptului că conțin un A, un C, un T, un G sau o deleție la poziția de testare. O sondă din fiecare set va fi complementară secvenței de ADN de tip sălbatic; toate celelalte sonde sunt complementare potențialelor mutații din aceeași poziție. Fiecare nucleotid din genă este verificat cu un set de cinci sonde, iar fiecare set de sonde este decalat cu un nucleotid față de nucleotida anterioară. Modelul se repetă pentru întreaga genă până când toate nucleotidele au fost verificate. Aceste sonde specifice sunt concepute pentru a testa mutații în *gena p53 umană*.

Genomul uman cuprinde atât structura genetică a genelor, cât și interrelațiile dintre ele . Se estimează că polimorfismele nucleotidice cu o singură bază (SNP) apar la aproximativ 15 milioane de poziții în cadrul genomului, unde aceste variații dezvăluie diferențe între indivizi. Anumite secvențe de SNP la un anumit locus sunt comune anumitor segmente de populație. În plus, unele SNP se cosegregă cu gene asociate cu anumite tulburări. Prin corelarea prezenței sau absenței unui anumit SNP cu o boală genetică, oamenii de știință pot utiliza SNP-urile ca markeri genetici. Prezența polimorfismelor SNP ca sonde pe un cip ADN permite oamenilor de știință să examineze simultan mii de gene care pot fi implicate în boli monogenice, precum și pe cele implicate în tulburări care prezintă moștenire multifactorială. Această tehnică, cunoscută sub numele de screening genomic, face posibilă analiza ADN-ului unei persoane pentru zeci sau sute de alele asociate cu boli, inclusiv cele care pot predispune indivizii la atacuri de cord , astm, diabet, boala Alzheimer și alte subtipuri de boli definite genetic. Deși tehnicile de screening genomic nu sunt încă utilizate pe scară largă , probabil că în următoarele decenii toți nou-născuții vor fi supuși unui screening genomic pentru a determina riscul lor de a dezvolta tulburări genetice pe parcursul vieții.

În cele din urmă, hibridizarea genomică comparativă (CGH) este o tehnică bazată pe cipuri ADN utilizată pentru a identifica variațiile numărului de copii (CNV) la nivelul întregului genom care pot fi implicate în tulburări genetice. Reamintim din capitolul 21 și din alte părți ale cărții că CNV-urile sunt inserții sau deleții relativ mari (între -500 pb și câțiva Mb) și că , împreună cu SNP-urile , acestea cuprind cea mai mare parte a variației genomice între indivizi. Dezvoltat inițial pentru a identifica modificările cromozomiale în probele tumorale, un cip CGH utilizează oligonucleotide care acoperă întregul genom al unei specii, pe baza secvenței de referință a speciei respective .

Cipurile CGH ale genomului uman sunt fabricate folosind cromozomi artificiali bacterieni (BAC), care conțin secvențe de referință care acoperă întregul genom . ADN-ul genomic de test de la un individ cu o tulburare completă și ADN- ul de control de la un individ sănătos sunt marcate diferențial cu markeri fluorescenți și apoi hibridizate cu cipul CGH . Odată ce cipul este scanat, raporturile de fluorescență de pe cip sunt analizate și utilizate pentru a indica prezența sau absența relativă a hibridizării în probe. Un nivel scăzut de legare (sau o lipsă completă de legare) a unei probe de ADN la un anumit câmp de pe cip poate indica prezența unui CNV . Cipul CGH este o modalitate rapidă de a examina genomul unui individ pentru variații ale CNV , dar această tehnică nu relevă variații genomice foarte mici și nici nu recunoaște translocațiile.

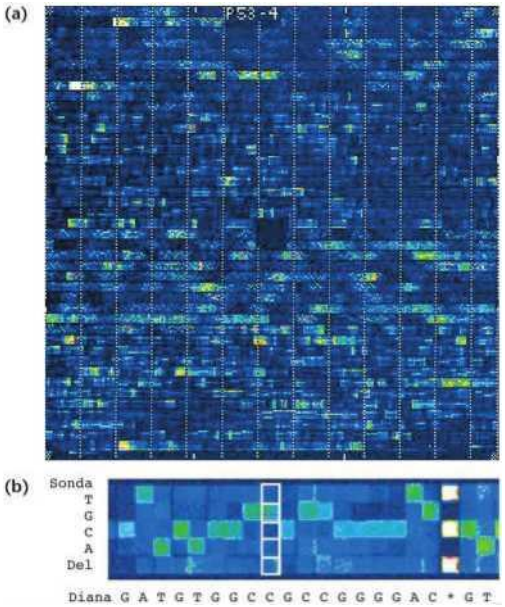


FIGURA 22.20 Un cip ADN GeneChip *p53* (Asymetrix, Inc.) după hibridizare cu produse PCR *p53* . (a) Acest cip ADN conține peste 65.000 de câmpuri, fiecare ocupând 50 de micrometri pătrați. Cipul verifică mutațiile în întreaga secvență codificatoare de 1,2 kb a genei p53 umane . Liniile punctate verticale sunt generate de câmpurile de control și permit alinierea cipului ADN în timpul scanării. (b) O porțiune mărită a cipului ADN *pS3* . Fiecare pătrat este un câmp în care ADN-ul testat s-a hibridizat sau nu. Fiecare rând reprezintă una dintre cele patru nucleotide sau o deleție la poziția de testare a sondei. Fiecare coloană reprezintă poziția nucleotidului verificat . Coloana evidențiată cu alb indică faptul că proba de ADN testat are un C în poziția corespunzătoare a secvenței *pS3* , dedusă prin hibridizare cu G în acest câmp. Coloana marcată cu un asterisc (•) este controlul de aliniere. Secvența genei *p53* Este prezentat sub fotografie.

sau investiții care pot contribui la apariția unor tulburări genetice .

Analiza genetică folosind cipuri de expresie genică

Cipurile de expresie genică sunt eficiente pentru analiza modelelor de expresie genică în bolile genetice, deoarece progresia țesutului de la o stare sănătoasă la una bolnavă este aproape întotdeauna însoțită de modificări în expresia a sute sau mii de gene. Aceste cipuri oferă un instrument puternic pentru diagnosticarea tulburărilor moștenite și a modificărilor în expresia genelor .

Acestea pot conține sonde doar pentru câteva gene specifice despre care se crede că sunt exprimate diferit în diferite tipuri de celule sau pot conține sonde care reprezintă fiecare genă din genom. Deși tehnicile bazate pe acest tip de cip oferă informații noi despre expresia genelor, rețineți că cipurile ADN nu oferă direct informații despre nivelurile de proteine dintr-o celulă sau țesut. Adesea, deducem ce niveluri de proteine ar putea fi pe baza modelelor de expresie a ARNm , dar acest lucru poate să nu fie întotdeauna foarte precis.

Într-o analiză tipică a unui cip de expresie genică , ARNm este izolat din două tipuri diferite de celule sau țesuturi - de exemplu, celule normale și celule canceroase aparținând aceluiași tip de celulă [Figura 22.21(a)]. Probele de ARNm conțin transcrieri ale fiecărei gene exprimate în acel tip de celulă. Unele gene sunt exprimate mai eficient decât altele; prin urmare, fiecare tip de ARNm va fi prezent la un nivel diferit . Nivelul fiecărui ARNm poate fi utilizat pentru a dezvolta un profil de expresie genică - caracteristic acelui tip de celulă particular . Moleculele de ARNm izolate sunt convertite în molecule de ADNc folosind transcriptază inversă . ADNc-urile din celulele normale sunt marcate cu nucleotide marcate cu un colorant fluorescent (de exemplu , verde), în timp ce ADNc-urile corespunzătoare din celulele canceroase sunt marcate cu un nucleotid marcat cu un colorant fluorescent diferit (de exemplu, roșu). ADNc-urile marcate sunt apoi amestecate și aplicate pe un cip ADN . Moleculele de ADNc se leagă de sondele complementare monocatenare de pe cip , dar nu și de celelalte sonde. Reamintim că fiecare câmp de pe cip nu este compus dintr-o singură sondă, ci conține mii de copii ale acesteia. După spălarea ADNc-ului nelegat , oamenii de știință scanează cipul cu un laser , iar un computer capturează imaginea fluorescentă pentru analiză. Modelul de hibridizare apare ca o serie de puncte colorate, fiecare punct corespunzând unuia dintre câmpurile cipului [Figura 22.21(b)].

Modelele de culoare afișate de câmpurile cip [Figura 22.21(c)] oferă o măsură destul de sensibilă a nivelurilor relative de ADNc prezent în amestec. În exemplul prezentat în figură , dacă un ARNm este prezent doar în celulele normale, sonda care reprezintă gena care codifică acel ARNm va apărea ca un punct verde , deoarece doar ADNc -urile „verzi” se vor fi hibridizat cu acesta. În mod similar, dacă un ARNm este prezent doar în

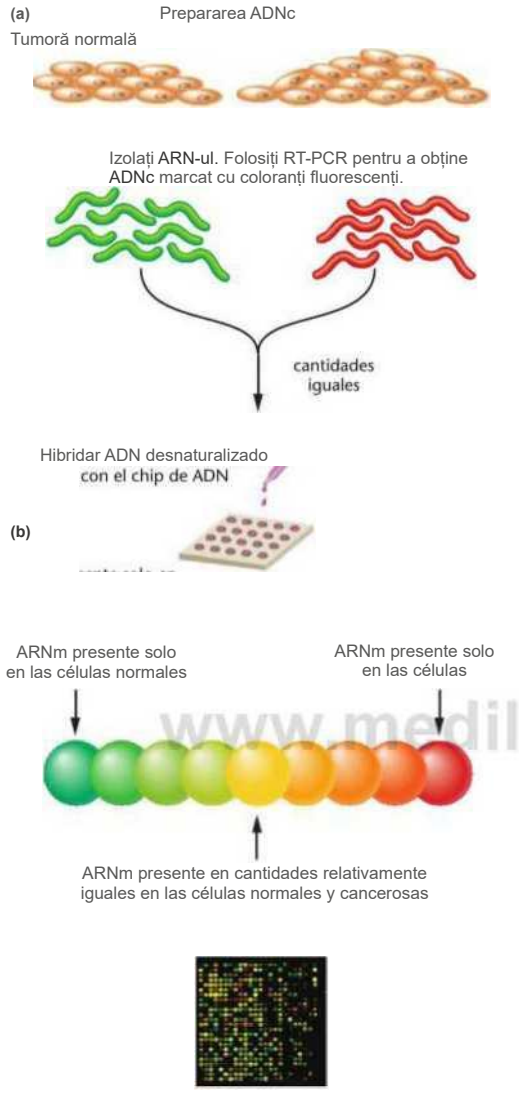

(a)
Prepararea ADNc
Tumoră normală
Izolați ARN-ul. Folosiți RT-PCR pentru a obține ADNc marcat cu coloranți fluorescenți.
cantidades iguales
Hibridar ADN desnaturalizado con el chip de ADN
(b)
ARNm presente solo en las células normales
ARNm presente solo en las células
ARNm presente en cantidades relativamente iguales en las células normales y cancerosas

FIGURA 22.21 (a) Procedură bazată pe cip ADN pentru analiza profilurilor de expresie genică în celulele normale și canceroase. (b) Metoda prezentată aici se bazează pe un cip cu două canale în care o serie de probe de ADNc corespunzătoare celor două țesuturi diferite concurează pentru a se lega de aceleași seturi de sonde. Culorile punctelor de pe un cip de expresie genică reprezintă nivelurile de expresie genică. În acest exemplu, punctele verzi reprezintă gene exprimate doar într-un singur tip de celulă (de exemplu, celule normale), în timp ce punctele roșii reprezintă gene exprimate doar în celălalt tip de celulă (de exemplu, celule canceroase). Culorile intermediare reprezintă diferite niveluri de expresie a aceleiași gene în cele două tipuri de celule. (c) O mică porțiune a unui cip ADN, care arată diferitele niveluri de hibridizare cu fiecare câmp. În celulele canceroase, sonda de pe cip corespunzătoare acelei gene va apărea ca un punct roșu. Dacă ambele probe conțin același ADNc și în aceleași cantități relative, ambele ADNc se vor hibridiza cu același câmp, care va apărea galben [Figura 22.21(b)]. Culorile intermediare indică faptul că ADNc-urile sunt prezente la niveluri diferite în cele două probe.

Profilurile de expresie genică obținute cu ajutorul cipurilor au relevat faptul că anumite tipuri de cancer au modele caracteristice de expresie genică și că aceste modele sunt corelate cu factori precum stadiul cancerului, evoluția clinică și răspunsul la tratament. Într -un astfel de experiment, oamenii de știință au examinat expresia genică atât în leucocitele normale, cât și în celulele corespunzătoare unui tip de cancer cu leucocite cunoscut sub numele de limfom difuz cu celule B mari (DLBCL). Aproximativ 40% dintre pacienții cu DLBCL răspund bine la chimioterapie și au perioade lungi de supraviețuire . Celelalte 60% nu răspund bine la terapie , iar perioadele de supraviețuire sunt scurte. Cercetătorii au analizat profilurile a 18.000 de gene și au descoperit două tipuri de DLBCL cu modele de expresie genică aproape inverse (Figura 22.22). Un tip de DLBCL, numit *limfom cu celule B cu centru -germinativ* (GCB), are un model de expresie genică foarte diferit de un al doilea tip, numit *limfom cu celule B activate* . Pacienții cu modelul de expresie genică corespunzător limfomului cu celule B activate au rate de supraviețuire mult mai mici decât pacienții cu modelul corespunzător limfomului cu celule B cu centru germinativ. Cercetătorii au concluzionat că DLBCL este, de fapt, două boli distincte cu rezultate diferite. Odată ce acest tip de analiză este introdus în utilizarea clinică zilnică, ar putea deveni posibilă adaptarea terapiei pentru fiecare grup de pacienți cu cancer și identificarea unor tratamente noi, specifice, bazate pe profilurile de expresie genică. Profiluri similare de expresie genică au fost generate pentru multe alte tipuri de cancer, inclusiv cancerul de sân, de prostată, ovarian și de colon. Cipurile de expresie genică oferă o multitudine de informații despre variațiile majore și subtile ale

bolilor genetice.

Mai multe companii promovează acum servicii de „nutrigenomică", susținând că utilizează cipuri de genotipare și expresie genică pentru a identifica polimorfisme alele și modele de expresie genică implicate în metabolismul nutrienților . De exemplu, o serie de polimorfisme în gene precum apolipoproteina A *(APOA1),* implicată în metabolismul lipidic, și MTHFR (metilentetrahidrofolat reductază), implicată în bolile cardiovasculare,

au fost asociate cu bolile cardiovasculare.

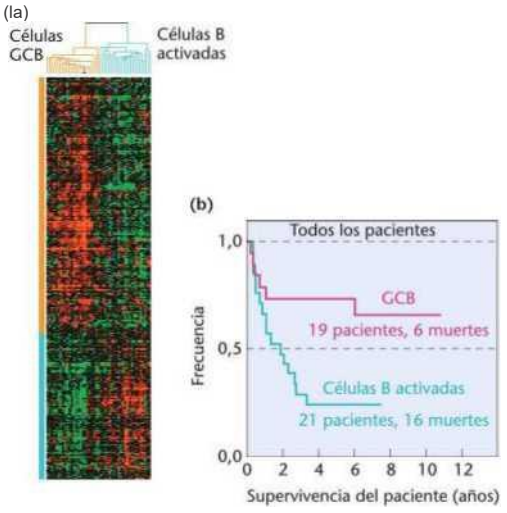


FIGURA 22.22 (a) Analiza expresiei genelor generată de cipuri ADN utilizate pentru a analiza 18.000 de gene exprimate în limfocite normale și canceroase. Fiecare rând reprezintă un rezumat al expresiei genelor pentru o anumită genă; fiecare coloană reprezintă date dintr-un eșantion de pacient cu cancer. Culorile reprezintă raporturile relative ale expresiei genelor în comparație cu celulele de control normale. Roșul reprezintă un nivel de expresie peste media găsită în controale, verdele reprezintă un nivel de expresie sub controale, iar intensitatea culorii reprezintă magnitudinea diferenței față de medie. În această analiză rezumativă, eșantioanele de pacienți cu cancer sunt grupate în funcție de gradul de similaritate al profilurilor lor de expresie genică. Grupul de eșantioane de pacienți cu cancer marcat cu portocaliu în partea de sus a figurii sunt DLBCL-uri cu celule B din centrul germinativ. Grupul albastru conține eșantioane de pacienți cu cancer aparținând grupului DLBCL cu celule B activate.
(b) Profilul expresiei genice și probabilitatea de supraviețuire. Pacienții cu profiluri corespunzătoare limfomului cu celule B activate au o rată a mortalității mult mai mare (16 din 21) decât cei cu profiluri corespunzătoare limfomului cu celule B cu centru germinativ (6 din 19). Date precum acestea demonstrează utilitatea analizei cipurilor ADN pentru diagnosticarea bolilor .

metabolismul acidului folic . Companiile de nutrigenomică susțin că analiza cipurilor ADN ale unei probe de pacient, în căutarea unor gene precum cele menționate , le permite să evalueze dacă variațiile alelice sau profilurile de expresie genică ale unui pacient recomandă modificări ale dietei pentru a îmbunătăți potențial sănătatea și a reduce riscul bolilor legate de dietă .

Aplicarea cipurilor ADN pentru analiza genotipică și exprimarea genelor agenților patogeni

Cipurile ADN oferă, de asemenea, cercetătorilor din domeniul bolilor infecțioase instrumente noi și puternice pentru studierea agenților patogeni . Cipurile de genotipare sunt utilizate pentru a identifica tulpinile virale emergente , cum ar fi virusul care provoacă sindromul respirator acut sever (SARS), extrem de contagios , sau virusul gripei aviare H5N1 , care a ucis peste două duzini de oameni în Asia , a forțat sacrificarea a peste 80 de milioane de pui și a ridicat îngrijorări cu privire la potențiale focare de pandemii .

Analiza transcriptomică a întregului genom a agenților patogeni este utilizată pentru a ajuta cercetătorii să determine ce gene sunt importante pentru infecția și replicarea agenților patogeni (Figura 22.23). Această tehnică utilizează bacterii, drojdii , protiști sau agenți patogeni virali pentru a infecta celulele gazdă in *vitro* , după care cipurile de expresie genică sunt utilizate pentru a analiza profilurile de expresie genică ale agenților patogeni . Modelele de activitate genică în timpul infecției cu agenți patogeni a celulelor gazdă și replicării ulterioare sunt utile pentru identificarea agenților patogeni și înțelegerea mecanismelor de infecție. Dar, desigur , unul dintre principalele obiective ale cercetării bolilor infecțioase este prevenirea infecției. Profilarea expresiei genice este, de asemenea, o tehnică utilă pentru identificarea genelor patogene importante și a proteinelor pe care le codifică , care ar putea deveni ținte potențiale pentru dezvoltarea de vaccinuri subunitare sau strategii de tratament medicamentos care vizează prevenirea sau controlul bolilor infecțioase . Această tehnică oferă în principal cercetătorilor informații despre modul în care un agent patogen răspunde la gazda sa .

În mod similar , cercetătorii evaluează răspunsurile gazdei la agenți patogeni (Figura 22.24). Acest tip de analiză a fost accelerat parțial de necesitatea de a dezvolta strategii de detectare a agenților patogeni pentru uz civil și militar , pentru a detecta focare de agenți patogeni naturali , cum ar fi SARS și gripa aviară, precum și pentru potențiala detectare a focarelor precum antraxul *(* cauzat de bacteria *Bacillus anthracis)* care ar putea fi rezultatul unui atac bioterorist. Profilurile de expresie genică a răspunsului gazdei sunt dezvoltate prin expunerea unei gazde la un agent patogen și apoi utilizarea cipurilor ADN pentru a analiza modelele de expresie genică ale acelei gazde .

Figura 22.24 prezintă diferitele profiluri de expresie genică obținute prin expunerea șoarecilor la *Neisseria*

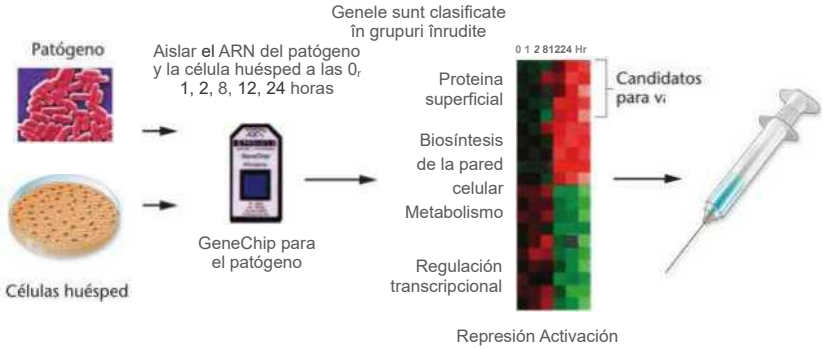


FIGURA 22.23 Analiza profilurilor de expresie ale întregului genom permite cercetătorilor să identifice genele care sunt exprimate activ atunci când agenții patogeni infectează celulele gazdă și se replică. Cunoașterea genelor care sunt critice pentru infecția cu agenți patogeni și replicarea ulterioară poate ajuta oamenii de știință să selecteze proteinele țintă drept candidate pentru potențiale vaccinuri și tratamente medicamentoase pentru prevenirea sau tratarea bolilor infecțioase.

Meningitidis, virusul SAKS sau E. *coli.* Rețineți în acest exemplu că, deși fiecare agent patogen fie intensifică, fie reprimă expresia mai multor gene, fiecare agent patogen induce puternic diferite grupuri proeminente de gene, dezvăluind un răspuns al gazdei la agentul patogen sub forma expresiei genelor și oferind o semnătură a infecției cu agentul patogen respectiv. Prin compararea acestor profiluri de expresie a genelor gazdă după expunerea la diferiți agenți patogeni, cercetătorii au o modalitate de a diagnostica și clasifica rapid bolile infecțioase. În viitor, oamenii de știință speră să dezvolte baze de date atât cu profiluri de expresie a răspunsului agentului patogen, cât și cu cele ale gazdei, care pot fi utilizate pentru a identifica eficient agenții patogeni.

22,6

Studiile de asociere la nivelul întregului genom permit identificarea variațiilor genomice care contribuie la apariția bolilor

Analiza genomică bazată pe cipuri ADN i-a determinat pe geneticieni să utilizeze strategii noi și puternice, numite studii de asociere la nivelul întregului genom (GWAS), în efortul lor de a identifica genele care pot influența riscul de îmbolnăvire . În ultimii cinci ani , s-a înregistrat o creștere uriașă a numărului de astfel de studii publicate. De exemplu, studiile de asociere la nivelul întregului genom pentru diferențele de înălțime, autism, obezitate, diabet, degenerescență maculară, infarct miocardic acut , artrită , hipertensiune arterială, diferite tipuri de cancer, tulburare bipolară, boli autoimune, boala Crohn , schizofrenie, scleroză laterală amiotrofică și scleroză multiplă au beneficiat de o acoperire largă în literatura științifică și în mass -media . Până în toamna anului 2010 , aproximativ 700 dintre aceste studii fuseseră deja publicate, legând aproape 3.000 de variații genetice de aproximativ 150 de trăsături diferite.

genom (GWS) ? Într-unul dintre aceste studii, sunt analizate genomurile a mii de indivizi fără legătură de rudenie cu o anumită boală. De obicei, analiza se efectuează folosind cipuri ADN, iar rezultatele sunt comparate cu genomurile persoanelor fără boala, în încercarea de a identifica variațiile genetice care pot crește riscul de a o dezvolta. Multe GWS implică utilizarea la scară largă a cipurilor SNP care permit screening -ul a aproximativ 500.000 de polimorfisme SNP pentru a evalua rezultatele pentru diferiți indivizi. Alte GWS se pot concentra pe identificarea diferențelor în gene specifice sau pe evaluarea variațiilor sau modificărilor CNV ale epigenomului , cum ar fi modelele de mediere în regiuni specifice ale unui cromozom . Aceasta implică determinarea polimorfismelor SNP , variațiilor CNV sau modificărilor epigenetice care apar.

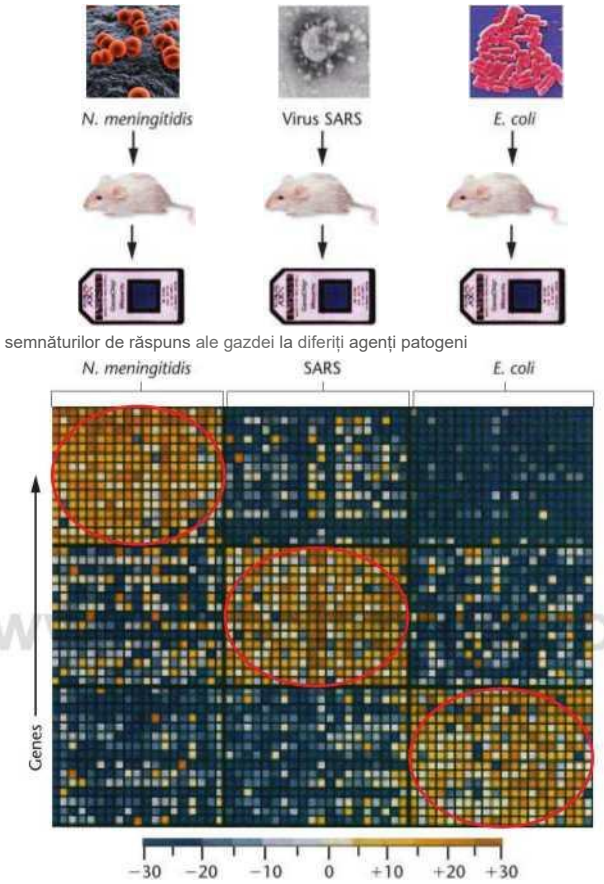


FIGURA 22.24 Cipurile de expresie genică pot dezvălui semnăturile de răspuns ale gazdei, permițând identificarea agenților patogeni. În acest exemplu, șoarecii au fost infectați cu diferiți agenți patogeni: *Neisseria meningitidis,* virusul care provoacă sindromul respirator acut sever (SARS) și

E. *coli.* Țesuturile de șoarece au fost apoi utilizate ca sursă de ARNm pentru analiză utilizând un cip de expresie genică. Nivelurile crescute de expresie, comparativ cu șoarecii de control neinfectați, sunt prezentate în diferite nuanțe de galben. Nivelurile reduse de expresie, comparativ cu șoarecii de control neinfectați, sunt indicate prin diferite nuanțe de albastru. Rețineți că fiecare agent patogen provoacă un răspuns oarecum distinct în ceea ce privește grupurile majore de gene gazdă care sunt activate de infecția cu agentul patogen (încercuite în figură).

La persoanele cu predispoziție la o boală, oamenii de știință pot calcula riscul de a dezvolta boala asociată cu fiecare variație genetică. Analizarea rezultatelor studiilor de asociere la nivelul întregului genom necesită utilizarea instrumentelor de analiză statistică pentru a prezice impactul relativ potențial (asociere sau risc) al unei variații genetice specifice asupra dezvoltării unui fenotip al bolii.

Figura 22.25 prezintă o reprezentare tipică a uneia dintre modalitățile prin care rezultatele studiilor de asociere la nivelul întregului genom sunt publicate în mod obișnuit . Aceste reprezentări se numesc grafice Manhattan și sunt „grafice de dispersie ” utilizate pentru a afișa seturi de date cu un număr mare de puncte. Axa *x* reprezintă de obicei diferitele poziții din cadrul genomului; în acest caz, loci -urile corespunzătoare

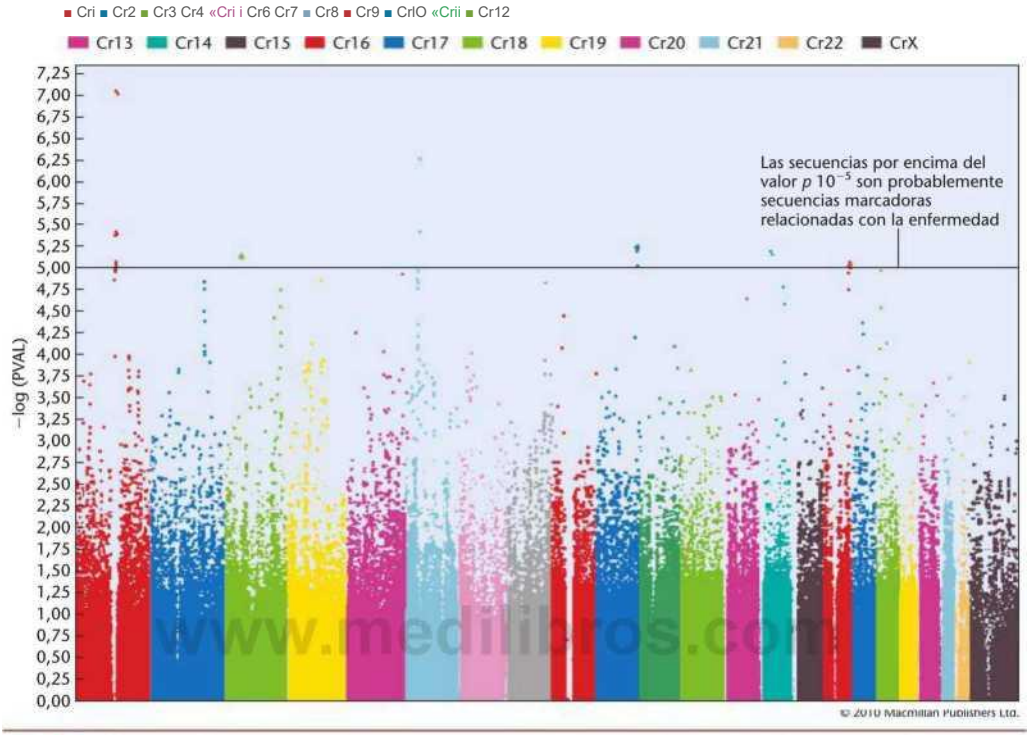

Cri Cr2 Cr3 Cr4 «Cri i Cr6 Cr7 Cr8 Cr9 CrlO «Crii Cr12
Cr13 Cr14 Cr15 Cr16 Cr17 Cr18 Cr19 Cr20 Cr21 Cr22 CrX
−log (PVAL)
7,25 7,00 6,75 6,50 6,25 6,00 5,75 5,50 5,25 5,00 4,75 4,50 4,25 4,00 3,75 3,50 3,25 3,00 2,75 2,50 2,25 2,00 1,75 1,50 1,25 1,00 0,75 0,50 0,25 0,00
Las secuencias por encima del valor p 10−5 son probablemente secuencias marcadoras relacionadas con la enfermedad
www.medilibros.com
© 2010 Macmillan Publishers Ltd.

FIGURA 22.25 **Un estudio de asociación de genoma completo para la diabetes tipo 2 reveló 386.371 marcadores genéticos,** agrupados aquí según el número cromosómico. Los marcadores situados por encima de la línea parecen estar significativamente asociados con la enfermedad.

Fiecare cromozom este desenat într-o culoare diferită. Valorile de pe axa y *sunt* obținute ca urmare a unui test de asociere a genotipului. Există mai multe modalități prin care se poate calcula o astfel de asociere. Cea prezentată aici este logaritmul valorilor *p* care arată că anumite loci sunt asociate semnificativ cu o anumită tulburare. Linia din partea de sus a graficului stabilește un prag de semnificație. Secvențele marker ale căror niveluri de semnificație depășesc 10^{-5} · ceea ce corespunde la 5,0 pe *axa y,* sunt secvențe probabil legate de boală (Figura 22.25).

Un studiu extrem de relevant, care a ajutat la ilustrarea - potențialului studiilor de asociere la nivelul întregului genom, a fost realizat în Statele Unite și Islanda, cu 4.500 de pacienți cu antecedente de atacuri de cord (tehnic infarcte miocardice) și 12.767 de pacienți din grupul de control. Această lucrare a fost realizată utilizând cipuri ADN care conțineau 305.953 de SNP-uri. Printre cele mai notabile rezultate, studiul a relevat variații ale genelor - supresoare tumorale de pe cromozomul 9 *(CDKN2A)* . și *CDKN2B).* Douăzeci și unu la sută dintre persoanele cu infarct miocardic au fost homozigote pentru mutații dăunătoare în genele CDKN2A și CDKN2B, iar aceste persoane au prezentat un risc de 1,6 ori crescut de infarct miocardic comparativ *cu* non - purtătorii , inclusiv - indivizii homozigoți pentru alelele de tip sălbatic . Aceste variații au fost corelate cu cele găsite la persoanele de origine europeană, dar până în prezent aceleași gene marker nu au fost identificate la afro-americani . Înseamnă acest lucru că aceste gene nu sunt factori de risc pentru infarctul miocardic în rândul afro- americanilor ?

Această întrebare reflectă una dintre numeroasele probleme și preocupări etice legate de pacienții implicați în studiile de asociere la nivelul întregului genom și de reacțiile lor emoționale la aflarea despre riscurile genetice . De exemplu,

- Ce înseamnă ca o persoană să aibă 3, 5, 9 sau 30 de alele de risc pentru o anumită boală?
- Cum putem clasifica alelele de risc rare, comune și cu frecvență scăzută pentru a determina riscul total de a dezvolta o boală?
- Studiile de asociere la nivelul întregului genom dezvăluie adesea zeci de variații ale ADN-ului, dar multe dintre aceste variații au doar o influență mică asupra nivelurilor de risc. Cum îi explicăm cuiva că are o variație genetică ce provoacă o modificare de 12 până la 16% a riscului său de a dezvolta o anumită boală pe parcursul vieții? Ce înseamnă cu adevărat aceste informații?
- Dacă suma totală a studiilor de asociere la nivelul întregului genom pentru o anumită boală relevă aproximativ 50% din alelele de risc, care sunt celelalte elemente de ereditabilitate lipsă care pot contribui la dezvoltarea unei boli complexe?

În unele cazuri, datele privind nivelul de risc relevate de studiile de asociere la nivelul întregului genom pot ajuta pacienții și medicii să dezvolte planuri alimentare și de exerciții fizice menite să minimizeze potențialul de a dezvolta o anumită boală. Însă numărul de gene de risc identificate de studiile de asociere la nivelul întregului genom indică faptul că, spre deosebire de tulburările monogenice, bolile genetice complexe implică o multitudine de factori genetici care contribuie la riscul general de a dezvolta o boală. Avem nevoie de aceste informații pentru a face progrese semnificative în diagnosticarea și tratarea bolilor, acesta fiind, în cele din urmă, unul dintre principalele obiective ale studiilor de asociere la nivelul întregului genom.

22,7

Genomica permite tratamente medicale noi, mai bine direcționate, inclusiv medicina personalizată și terapia genică.

Tehnologiile genomice schimbă lumea diagnosticului medical și permit oamenilor de știință să producă proteine terapeutice abundente și eficiente. Exemplele deja disponibile astăzi oferă dovezi puternice că în viitorul apropiat vom vedea un număr și mai mare de tratamente medicale transformative bazate pe genomică și tehnologii avansate bazate pe ADN. În această secțiune, vom oferi o scurtă introducere în farmacogenomică și proiectarea rațională a medicamentelor, subiecte care vor fi discutate mai detaliat în Capitolul Special II , Genomică și Medicină Personalizată , și vom examina tehnicile de terapie genică utilizate pentru tratarea bolilor genetice.

Farmacogenomică și proiectarea rațională a medicamentelor

În fiecare an, peste două milioane de americani se confruntă cu - efecte secundare grave ale medicamentelor , iar peste 100.000 decedează din cauza reacțiilor adverse la medicamente . În plus, majoritatea medicamentelor sunt eficiente doar pentru aproximativ 50 % din populație . Până acum, selectarea medicamentului potrivit pentru fiecare pacient era un proces aleatoriu de încercări și erori. Domeniul emergent al farmacogenomicii promite să conducă la - dezvoltarea unor medicamente personalizate mai precise și mai eficiente , concepute pentru a completa structura genetică unică a fiecărei persoane .

-un fel, farmacogenomica a început în anii 1950, când oamenii de știință au descoperit că reacțiile la medicamente au o componentă ereditară . Acum știm că multe gene afectează modul în care diferiți oameni reacționează la medicamente . Unele dintre aceste gene codifică produse, cum ar fi receptorii de la suprafața celulară , care se leagă de un medicament și îi permit acestuia să intre în celulă , în timp ce altele codifică enzime care metabolizează medicamentele . De exemplu, enzimele *hepatice* codificate de familia de gene a citocromului P450 . Aceste gene afectează metabolismul multor medicamente moderne, inclusiv al celor utilizate pentru tratarea tulburărilor cardiovasculare și neurologice . Variațiile secvenței ADN a acestor gene au ca rezultat enzime cu capacități diferite de metabolizare și *utilizare* a acestor medicamente . Prin urmare , variantele genetice care codifică forme inactive ale enzimelor citocromului P450 ... Aceste variante sunt asociate cu incapacitatea organismului de a descompune medicamentele , ceea ce duce la supradoze . Un test genetic care recunoaște unele dintre aceste variante este utilizat în prezent pentru a identifica pacienții care sunt apoi recrutați pentru a participa la studii clinice ale unor noi medicamente.

Un alt exemplu este reacția anumitor persoane la medicamentele tiopurinice utilizate pentru tratarea leucemiilor infantile (Figura 22.26). Unele persoane prezintă variații de secvență în gena care codifică enzima tiopurin metiltransferază (TPMT), care descompune tiopurinele. Unele medicamente anticancerigene utilizate în mod obișnuit pentru tratarea leucemiei, cum ar fi 6-mercaptopurina (6-MP), au o structură tiopurinică. La persoanele cu mutații în *gena TPMT,* medicamentele

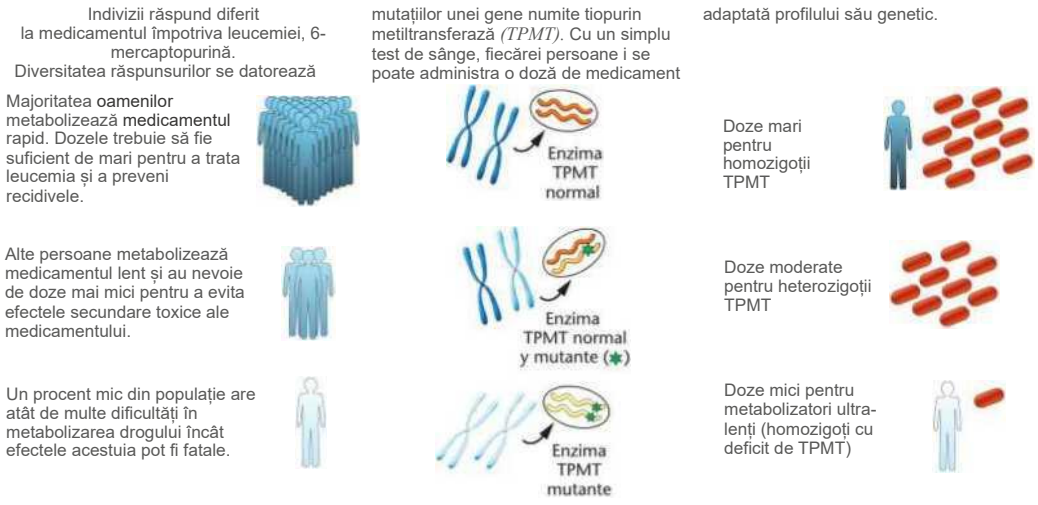


FIGURA 22.26 Tehnici farmacogenomice pentru dezvoltarea de medicamente în vederea reducerii mortalității. Persoane diferite cu aceeași boală, în acest caz, leucemie infantilă, pot răspunde diferit la tratamentele medicamentoase din cauza unor diferențe subtile în expresia genelor. O doză de medicament anticancerigen, cum ar fi 6-MP, care funcționează bine pentru o persoană, poate fi toxică pentru alta. Un simplu test genetic sau enzimatic pentru identificarea variațiilor genetice poate permite medicilor să prescrie tratament medicamentos și doze pe baza profilului genetic al fiecărui individ.

Medicamentele anticancerigene cu tiopurină se pot acumula până la niveluri toxice . Drept urmare, unii pacienți, cum ar fi cei homozigoți pentru gena *TPMT* de tip *sălbatic* , răspund bine la tratamentul cu 6-MP, în timp ce alții care sunt heterozigoți sau homozigoți pentru mutațiile TPiMT pot *prezenta* reacții severe sau chiar fatale la 6-MP. Un test genetic a fost dezvoltat inițial pentru a detecta variantele genei TPMT . Însă acum , o simplă analiză de sânge este suficientă pentru ca medicii să adapteze doza de medicament la fiecare individ. Datorită acestei noi tehnologii, efectele toxice ale 6-MP au fost reduse, iar ratele de supraviețuire pentru pacienții cu leucemie infantilă tratați cu 6-MP au crescut - un exemplu excelent de farmacogenomică în acțiune.

Mai multe metode sunt în curs de dezvoltare pentru a extinde utilizarea farmacogenomicii. O metodă foarte promițătoare implică detectarea polimorfismelor cu un singur nucleotid (SNP). Cercetătorii ar putea într -o zi să identifice o secvență SNP comună în ADN -ul persoanelor care au , de asemenea , o reacție medicamentoasă moștenită. Dacă SNP-ul se separă de o parte a genomului care conține gena responsabilă de reacția medicamentoasă, ar putea deveni posibilă dezvoltarea de teste genetice bazate pe SNP fără a cunoaște măcar identitatea genei responsabile de reacția medicamentoasă. În viitor , cipurile ADN ar putea fi utilizate pentru a analiza genomul unui pacient pentru reacții multiple la medicamente .

Cunoștințele din genetică și biologie moleculară contribuie, de asemenea, la dezvoltarea de noi medicamente care vizează molecule asociate cu boli specifice . Cea mai mare parte a dezvoltării de medicamente se bazează în prezent pe proceduri de încercare și eroare cu substanțe chimice pe animale de laborator , în speranța de a găsi o substanță cu un efect util . În schimb, proiectarea rațională a medicamentelor implică sinteza unor substanțe chimice specifice care afectează anumite produse genetice . Un exemplu de produs bazat pe tehnici de proiectare rațională este noul medicament - imatinib , comercializat sub denumirea de Gleevec în Statele Unite și Glivec în Europa și Australia , utilizat pentru tratarea leucemiei mieloide cronice (LMC). Geneticienii au descoperit că celulele din LMC conțin cromozomul Philadelphia, care este rezultatul unei translocații reciproce între cromozomii 9 și 22. Clonarea genelor a relevat că translocația t(9;22) creează o fuziune a proto - oncogenei *C-ABL* . cu gena BCR . Această genă de fuziune *BCR-ABL* codifică

o proteină

de fuziune puternică ce permite celulelor să scape de mecanismele de control al ciclului celular. Proteina de fuziune, care acționează ca o tirozin kinază, nu este prezentă în celulele necanceroase ale pacienților cu LMC.

Pentru a dezvolta Glivec, chimiștii au căutat exhaustiv în - biblioteci chimice până când au găsit o moleculă care se lega de enzima BCR-ABL. După efectuarea unor modificări chimice astfel încât molecula inhibitoare să se lege mai strâns, testele au arătat că aceasta inhibă în mod specific activitatea BCR-ABL. Studiile clinice au arătat că Glivec a fost eficient împotriva LMC , cu efecte secundare minime și o rată de remisie mai mare decât terapiile convenționale. Glivec este acum utilizat pentru a trata LMC și alte câteva tipuri de cancer. Pe măsură ce oamenii de știință continuă să descopere tot mai multe gene și produse genetice asociate cu bolile, proiectarea rațională a medicamentelor promite să devină o tehnologie de mare interes în următorul deceniu.

Terapia genică

Deși tratamentele medicamentoase sunt adesea eficiente în controlul simptomelor tulburărilor genetice, rezultatul ideal al oricărui tratament medical este vindecarea . În încercarea de a vindeca tulburările genetice , oamenii de știință investighează activ terapia genică - o tehnică terapeutică ce implică transferul de gene normale în celulele unui pacient . În teorie, genele normale ar fi transcrise și traduse în produse genetice funcționale, ceea ce ar duce apoi la un fenotip normal.

Una dintre cheile terapiei genice este existența unui sistem de administrare care permite transferul genelor la un pacient. În multe studii de terapie genică, oamenii de știință utilizează retrovirusuri modificate genetic ca vectori. Un exemplu este un vector bazat pe un virus de șoarece numit virusul leucemiei murine Moloney (MLV). Pentru a transfera gene în celule, se utilizează forme dezactivate de virusuri adeno-asociate (AAV), care în forma lor nativă infectează aproximativ 80-90% din populație în timpul copilăriei, precum și metode non-virale, cum ar fi transferul chimic de gene prin membranele celulare și fuziunea celulară cu vezicule artificiale care conțin secvențe de ADN clonate. Vectorii retrovirali sunt creați prin eliminarea unui grup de trei gene din virus și inserarea unei gene umane clonate. După ambalarea acesteia într-un înveliș proteic viral, vectorul recombinant este utilizat pentru a infecta celulele. Odată ajuns în interiorul unei celule , virusul nu se poate replica din cauza genelor virale lipsă . În celulă , virusul recombinant cu gena umană inserată călătorește spre nucleu , se integrează într -un situs de pe un cromozom și devine parte a genomului. Dacă gena inserată este exprimată, aceasta dă naștere unui produs genetic normal care poate fi capabil să corecteze mutația purtată de individul afectat . În primele încercări de terapie genică , au fost tratate mai multe tulburări moștenite , inclusiv imunodeficiența combinată severă (SCID), hipercolesterolemia familială și fibroza chistică .

Terapia genică la om a început în 1990 , odată cu tratamentul unei tinere pe nume Ashanti DeSilva [Figura 22.27(a)], care suferă de o tulburare ereditară numită imunodeficiență combinată severă (SCID). Persoanele cu SCID nu au un sistem imunitar funcțional și adesea mor din cauza a ceea ce în mod normal ar fi infecții minore. Ashanti are o formă autosomală de SCID cauzată de o mutație a genei care codifică enzima adenozin deaminază (ADA). Terapia ei genică a început când medicii au izolat câteva dintre limfocitele ei T [Figura 22.27(b)]. Aceste celule, care sunt componente cheie ale sistemului imunitar, au fost amestecate cu un vector retroviral care poartă o copie inserată a genei *ADA* . Normal. Virusul a infectat multe dintre limfocitele T, inserând o copie normală a genei ADA în *genomul unora dintre aceste limfocite.* După amestecarea lor cu vectorul , limfocitele T au fost cultivate în laborator și testate pentru a se asigura că gena *ADA* transferată a fost exprimată (Figura 22.27). Aproximativ un miliard dintre aceste limfocite T modificate genetic au fost apoi injectate în fluxul sanguin al lui Ashanti . Unele dintre aceste limfocite T au migrat în măduva osoasă și au început să se dividă și să genereze celule fiice care au produs , de asemenea, ADA . Această pacientă prezintă acum expresia proteinei ADA în 25 până la 30 % din limfocitele sale T , ceea ce este suficient pentru a -i permite să ducă o viață normală .

Până în prezent , terapia genică a redat sănătatea la aproximativ 20 de copii afectați de SCID. Deși terapia genică a fost dezvoltată inițial ca tratament pentru bolile moștenite monogenice, tehnica a fost rapid adaptată pentru a trata boli dobândite , cum ar fi cancerul, bolile neurodegenerative, bolile cardiovasculare și bolile infecțioase precum HIV . În cazul HIV , oamenii de știință explorează modalități de a administra gene imunostimulatoare care pot face oamenii rezistenți la infecția cu HIV sau pot dezactiva virusul la persoanele care trăiesc cu HIV . Numai în Statele Unite , aproape 1.000 de studii clinice privind terapiile genice sunt în curs de desfășurare . Pe o perioadă de zece ani , din 1990 până în 1999 , peste 4.000 de persoane au fost supuse terapiilor genice pentru diverse tulburări genetice. Aceste studii au eșuat ...

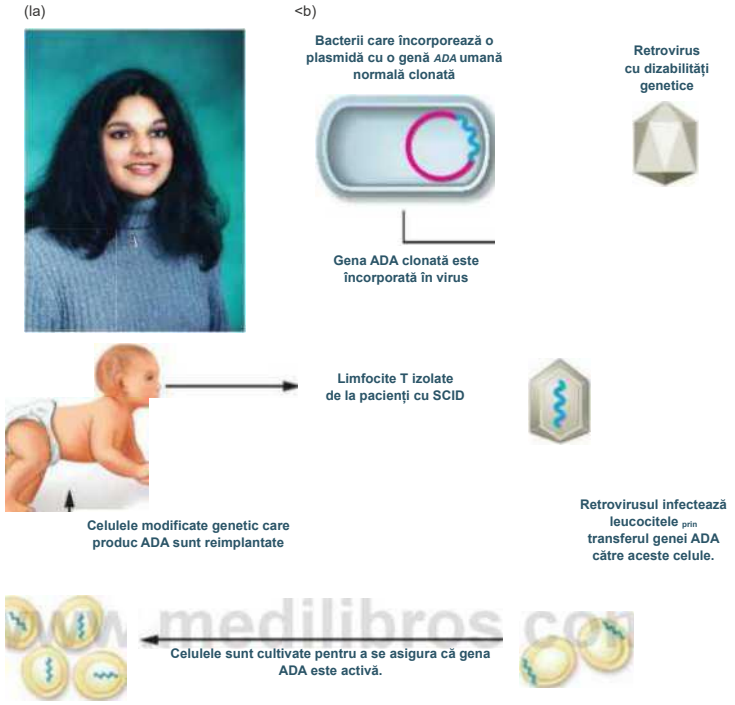

(la)
<b)
Bacterii care încorporează o plasmidă cu o genă ADA umană normală clonată
Retrovirus cu dizabilități genetice
Gena ADA clonată este încorporată în virus
Limfocite T izolate de la pacienți cu SCID
Celulele modificate genetic care produc ADA sunt reimplantate
Retrovirusul infectează leucocitele prin transferul genei ADA către aceste celule.
Celulele sunt cultivate pentru a se asigura că gena ADA este activă.

FIGURA 22.27 (a) Ashanti DeSrIva, prima persoană care a suferit terapie genică, (b) Pentru a trata boala sclerotică subcutanată (SCld) folosind terapia genică, o genă ADA umană clonată este transferată într-un vector viral, iar vectorul este apoi utilizat pentru a infecta leucocitele prelevate de la pacient. Gena ***ADA transferată*** este încorporată într-un cromozom ***şi*** devine activă. După cultivare pentru a le crește numărul, celulele sunt reinserate în pacient, unde produc ADA, permițând dezvoltarea unui răspuns imun.

în multe ocazii, ceea ce a dus la pierderea încrederii în terapia genică.

Speranțele pentru terapia genică au fost spulberate și mai mult în septembrie 1999, când adolescentul Jesse Geisingei a murit în timp ce urma o terapie genică pentru tratarea unei boli hepatice. Moartea sa a fost cauzată de un răspuns inflamator masiv la vector, un adenovirus modificat, unul dintre virusurile care provoacă răceli și infecții respiratorii. În timpul tratamentului, un număr mare de vectori adenovirali care purtau gena pentru orraftinfl trrtwsciirtíiMiiJiisa (OTC) au fost injectați în artera sa hepatică . Se aștepta ca vectorii virali să se depună în ficat , să pătrundă în celulele hepatice și să declanșeze producerea proteinei OTC. La rândul său, proteina OTC ar putea corecta defectul său genetic și poate chiar să-i vindece afecțiunea hepatică. Cu toate acestea, la

câteva ore de la primul tratament, corpul lui Jesse a suferit o reacție imună masivă. A dezvoltat febră mare, plămânii i s-au umplut de lichid, a suferit insuficiență multiplă de organe și a murit patru zile mai târziu din cauza insuficienței respiratorii acute.

În urma tragediei, au fost efectuate mai multe investigații științifice și guvernamentale . Aceste investigații au relevat că oamenii de știință care au efectuat studiul clinic nu au raportat reacțiile adverse anterioare la terapia genică și s-a descoperit, de asemenea, că unii dintre oamenii de știință aveau legături cu companii private care ar fi putut câștiga financiar de pe urma studiilor. S-a constatat că pacienții nu fuseseră informați, atunci când li s-a cerut să își dea consimțământul pentru a participa la studii, despre efectele secundare grave observate în studiile pe animale și s-a constatat, de asemenea, că unele studii clinice progresau prea rapid, in ciuda datelor

care recomandau prudență. Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA) a examinat cu atenție studiile clinice privind terapia genică la nivel național, a oprit unele și a închis mai multe programe de terapie genică. Alte grupuri de cercetare și-au suspendat voluntar studiile de terapie genică. Au fost impuse restricții mai stricte asupra protocoalelor studiilor clinice pentru a corecta unele dintre problemele procedurale care fuseseră identificate în urma cazului Gelsinger. Moartea lui Jesse a dat o lovitură gravă domeniului emergent al terapiei genice - o lovitură de pe urma căreia încă se confrunta când a lovit o a doua tragedie.

Viitorul terapiei genice părea să se lumineze în anul 2000, când un grup de cercetători francezi a raportat primul succes la scară largă în acest tip de terapie. Nouă copii cu un tip fatal de SCID legat de cromozomul X au dezvoltat sisteme imunitare funcționale după ce au fost tratați cu un vector retroviral care purta o genă normală. Rapoartele publicate despre acest studiu au fost întâmpinate cu mare entuziasm de către comunitatea de cercetare în terapia genică. Dar euforia s-a transformat în disperare în 2003, când a devenit clar că doi dintre cei zece copii care fuseseră vindecați de SCID legat de cromozomul X au dezvoltat leucemie ca o consecință directă a terapiei, iar unul dintre ei a murit ca urmare a tratamentului. La doi dintre copii, celulele canceroase conțineau vectorul retroviral, inserat în apropierea sau în interiorul unei gene numite *LMO2.* Această inserție a activat *gena LMO2,* provocând proliferarea necontrolată a leucemiei și dezvoltarea leucemiei . FDA a oprit imediat 27 de studii clinice similare privind terapia genică, iar acest domeniu de cercetare a suferit o altă transformare profundă. În 2005, un al treilea copil din studiul francez X-SCID a dezvoltat leucemie, probabil ca urmare a terapiei genice.

Până la succesul aparent al studiilor clinice franceze asupra X-SCID, terapia genică a suferit nu doar de pe urma scandalurilor și a criticilor intense cu care s-a confruntat după moartea lui Jesse Gelsinger, ci și de pe urma scepticismului multor oameni de știință și al publicului larg cu privire la fezabilitatea acestei tehnici terapeutice, care fusese primită cu atâta fast. Până în prezent, niciun produs de terapie genică destinat uzului uman nu a fost aprobat pentru comercializare . Criticii terapiei genice continuă să acuze grupurile de cercetare că își grăbesc munca , că au conflicte de interese, că gestionează defectuos studiile clinice și că fac multe promisiuni , dar livrează foarte puține rezultate. Majoritatea problemelor asociate cu terapia genică s-au dovedit a fi legate de vectorii utilizați pentru transferul genelor terapeutice în celule.

Acești vectori, inclusiv virusurile MLV și adenovirusurile , prezintă mai multe dezavantaje serioase . În primul rând, integrarea genomurilor retrovirale (inclusiv a genei terapeutice umane) în genomul celulei gazdă are loc numai dacă celulele gazdă își replică ADN-ul. În organism, doar un număr mic de celule din fiecare țesut se divid și își replică ADN-ul. În al doilea rând , majoritatea vectorilor virali sunt capabili să declanșeze un răspuns imun la pacient , așa cum s-a întâmplat în cazul lui Jesse Gelsinger. În al treilea rând , inserarea genomurilor virale în cromozomii gazdă poate activa sau muta o genă esențială, ca în cazul celor trei pacienți francezi. Integraza virală , enzima care permite integrarea genomului viral în genomul gazdă , interacționează cu proteinele asociate cromatinei , rezultând o tendință de integrare cu gene active transcripțional. Din păcate , nu este încă posibil să se direcționeze în mod fiabil inserarea genelor terapeutice către locații specifice din genom, deși inserarea genelor direcționate este unul dintre principalele domenii de cercetare actuale .

În al patrulea rând , retrovirusurile nu pot purta secvențe de ADN mult mai mari de 8 kb . Multe gene umane sunt mai mari decât aceasta. În cele din urmă , există posibilitatea de a crea virusuri complet infecțioase dacă vectorul se recombină cu un alt genom viral deja prezent în celula gazdă .

Pentru a aborda aceste provocări, se dezvoltă noi vectori virali și strategii de transfer al genelor în celule , pentru a îmbunătăți eficacitatea și siguranța vectorilor . Cercetătorii speră că noile sisteme de administrare a genelor vor depăși problemele inerente vectorilor utilizați anterior și vor permite un control precis atât al locurilor de inserție, cât și al nivelurilor de produs genetic produs de genele terapeutice .

Pe lângă problemele legate de vectori pe care tocmai le- am discutat , trebuie depășite și alte câteva bariere pentru ca terapia genică să devină un tratament viabil și fiabil pentru multe tulburări genetice . Printre aceste probleme nerezolvate se numără următoarele :

- Care este calea potrivită pentru livrarea genelor în diferite tipuri de afecțiuni? De exemplu, care este cea mai bună metodă de tratare a țesutului cerebral sau muscular ? Tehnicile de livrare a genelor specifice țesuturilor sunt esențiale.
- Ce procent din celulele dintr -un organ sau țesut trebuie să exprime o genă terapeutică pentru a atenua efectele unei tulburări genetice ?
- Ce cantitate dintr- un produs genetic terapeutic trebuie produsă pentru ca pacientul să experimenteze

o îmbunătățire de durată și cum poate fi garantată o producție suficientă ? În prezent , multe tehnici de terapie genică oferă doar o sursă pe termen scurt de genă terapeutică și proteina sa.

- Va fi posibilă utilizarea terapiilor genice pentru tratarea - bolilor care implică mai multe gene?
- Poate fi controlată expresia genelor terapeutice la un pacient?

Mai multe studii mediatizate pe scară largă, efectuate între 2008 și 2010, au dat rezultate promițătoare. De exemplu, cercetătorii de la Universitatea din Pennsylvania au folosit terapia genică pentru a restabili funcția conurilor retiniene și vederea diurnă la câinii care sufereau de o afecțiune numită acromatopsie congenitală. Acromatopsia este o tulburare autosomal recesivă rară (care afectează 1 din 30.000 până la 50.000 de oameni) care afectează - conurile retiniene, care sunt esențiale pentru vederea culorilor și anumite aspecte ale acuității vizuale. Terapia a vindecat atât câinii tineri, cât și pe cei adulți, iar rezultatele par a fi permanente.

Cercetătorii de la Universitatea din Pennsylvania și de la Spitalul de Copii din Philadelphia au raportat, de asemenea, rezultate benefice în urma tratamentelor pentru amauroza - congenitală Leber (LCA), o boală degenerativă a retinei care afectează 1 din 50.000 până la 100.000 de copii în fiecare an și provoacă orbire severă. Injecțiile cu gena normală au fost administrate pacienților adulți tineri cu defecte ale genei *RPE65.* Rezultate similare au fost raportate și în studiile clinice pe oameni efectuate în Italia și Regatul Unit, unde au început primele studii clinice pe oameni pentru LCA . Vederea completă nu a fost restabilită la acești pacienți. La câteva luni după un tratament cu o singură genă, pacienții rămân orbi din punct de vedere legal , dar percep mai multă lumină; unii pot citi linii pe o diagramă optică, iar doi dintre cei care au încercat să parcurgă un traseu cu obstacole au reușit să îl finalizeze.

Cercetătorii de la Universitatea din Paris și de la Facultatea de Medicină Harvard au raportat că, la doi ani după ce a urmat terapie genică pentru β1-talasemie, o afecțiune a sângelui cauzată de un defect al lanțului β1-globinei care reduce producția de hemoglobină , un tânăr nu mai necesită transfuzii și pare a fi sănătos. Un virus HIV modificat, dezactivat, a fost utilizat pentru a transporta o copie a genei normale, deși au existat rapoarte despre integrarea genei terapeutice în apropierea genei pentru un factor de creștere numit *HMGA2,* provocând inactivarea acesteia, similar cu ceea ce s-a întâmplat în studiile franceze cu X -SCID.

Oamenii de știință lucrează, de asemenea, la tehnici de înlocuire a genelor care implică eliminarea unei gene defecte din genom. Studiile recente cu enzime numite nucleaze cu degete de zinc par foarte promițătoare în modelele animale și culturile celulare. Aceste enzime pot face o tăietură specifică în cadrul genomului și, atunci când sunt cuplate cu anumite interfaciale, pot permite editarea genelor prin eliminarea secvențelor defecte și inserarea secvențelor omoloage normale în genom. S-au înregistrat progrese promițătoare în acest domeniu folosind organisme model, cum ar fi șoarecii; cu toate acestea, această tehnologie nu a avansat încă suficient pentru a fi utilizată la oameni. S-au făcut încercări de a utiliza oligonucleotidele antisens pentru a inhiba traducerea ARNm-urilor din genele defecte, dar această tehnică de terapie genică nu s -a dovedit, în general, fiabilă.

Apariția recentă a ARN-ului interferent ca instrument puternic de reducere a expresiei genice a dat un nou impuls tehnicilor de terapie genică bazate pe reducerea expresiei genice . După cum am văzut în Capitolul 17, ARN-ul interferent (ARNi) este o formă de reglare a expresiei genelor (vezi Figura 17.16). La animale, molecule scurte de ARN dublu catenar sunt inserate în celule și scindate în interiorul celulei de către enzima Dicer în fragmente de 21 de nucleotide numite ARN-uri mici interferente (siARN). SiARN-urile se leagă apoi de un complex enzimatic numit complex de reducere a expresiei indus de ARN (RISC), care transportă siARN-urile la ARNm-ul lor țintă, unde se leagă prin împerecherea bazelor complementare . Complexul RISC poate fie bloca traducerea ARNm-urilor legate de siARN, fie poate provoca degradarea ARNm-urilor legate de siARN , împiedicându-le să fie traduse în proteine.

Una dintre principalele provocări cu care se confruntă metodele terapeutice bazate pe ARNi până în prezent este administrarea *in vivo* a siARN-ului, sau ARN bicatenar . ARN-urile se degradează rapid în organism. De asemenea , este dificil să le facem să penetreze celulele și să acționeze asupra țesutului corect. De exemplu, cum putem administra terapii pe bază de ARN celulelor canceroase, dar nu și celulelor sănătoase, necancereze ? Două tehnici comune de administrare implică injectarea directă a siARN-ului sau administrarea acestuia prin intermediul unui vector plasmidic care este integrat de celule și transcris pentru a forma ARN bicatenar, care poate fi apoi scindat de Dicer într- o serie de siARN-uri.

În Statele Unite, sunt în desfășurare mai multe studii clinice care utilizează ARNi pentru tratarea orbirii . O strategie bazată pe ARNi pentru tratarea unui tip de orbire numită degenerescență maculară vizează o genă numită

VEGF. Proteina VEGF promovează creșterea vaselor de sânge. Supraexprimarea acestei gene, care provoacă o producție excesivă de vase de sânge în retină, duce la pierderea vederii și poate duce în cele din urmă la orbire. Mulți oameni de știință speră că această boală va deveni în curând prima tratabilă cu terapii bazate pe ARNi. Alte boli care sunt candidate pentru tratamentul cu ARNi includ diverse tipuri de cancer, diabet, scleroză multiplă și artrită.

Întrebarea dacă terapia genică se poate recupera după eșecurile din trecut și își poate îndeplini promisiunea de a oferi un leac pentru bolile genetice rămâne nerezolvată. Mulți oameni de știință consideră că ar trebui să continuăm cercetarea terapiilor genice și să efectuăm studii clinice în ciuda acestor eșecuri. Cu toate acestea, trebuie spus că cei care lucrează astăzi în acest domeniu au o viziune mai sobră asupra progresului său. Studiile clinice ale oricărei terapii noi sunt potențial periculoase, iar studiile pe animale adesea nu reușesc să reflecte cu exactitate modul în care oamenii vor reacționa la un nou medicament sau o nouă procedură. Inevitabil, în studiile clinice vor apărea mai multe reacții adverse la terapia genică, chiar dacă metodele devin din ce în ce mai eficiente. Poate că ar trebui să privim terapia genică în același mod în care am privit antibioticele, transplanturile de organe și călătoriile în spațiu. Vor exista eșecuri și chiar tragedii, dar puțin câte puțin, pas cu pas, ne vom apropia de punctul în care putem avea o tehnologie care ar putea într-o zi să ofere leacul pentru multe boli genetice grave.

ACUM REZOLVĂ ASTA

22.5 Terapia genică pentru tulburările genetice umane implică transferul unei copii a genei umane normale către un vector și utilizarea vectorului pentru a transfera gena umană clonată către țesuturile țintă . Se așteaptă ca gena să pătrundă în țesutul țintă și să se activeze, iar produsul genetic se așteaptă să amelioreze simptomele.

- **(a) De ce sunt dificil de tratat boli precum distrofia musculară cu terapii genice?**
- **(b) Care sunt potențialele probleme legate de utilizarea - retrovirusurilor ca vectori ?**
- **(c) Ar trebui terapiile genice aplicate țesuturilor germinale , mai degrabă decât țesuturilor somatice ? Care sunt potențialele probleme etice asociate cu primele ?**

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne îndeamnă să luăm în considerare potențialele provocări asociate cu terapia genică pentru distrofia musculară. Cheia rezolvării acesteia constă în luarea în considerare a tipului de țesuturi afectate la pacienții cu distrofie musculară.*

22,8

Ingineria genetică, genomica și biotehnologia ridică întrebări etice, sociale și juridice.

Geneticienii utilizează tehnologiile ADN genomice și recombinant pentru a identifica gene, a diagnostica și trata boli genetice, a fabrica produse comerciale și farmaceutice și a rezolva crime. Cu toate acestea, aplicațiile care decurg din aceste tehnologii ridică importante întrebări etice , sociale și juridice care trebuie identificate, dezbătute și rezolvate. Aici, vom prezenta o scurtă prezentare generală a unora dintre dezbaterile etice care au loc în prezent cu privire la utilizarea tehnologiilor genetice.

Îngrijorări legate de organismele și alimentele modificate genetic

Majoritatea produselor alimentare modificate genetic conțin o genă exogenă care codifică o proteină , conferindu-le o trăsătură specifică dorită (de exemplu, rezistență la erbicide sau insecte) . Multe preocupări legate de plantele modificate genetic se concentrează pe siguranța consumatorilor și pe consecințele asupra mediului. Este sigur să consumi plante modificate genetic ? În general, dacă proteinele nu sunt toxice sau alergenice și nu au alte efecte fiziologice negative , acestea nu sunt considerate un pericol semnificativ pentru sănătate. În Europa și Asia, alimentele care conțin ingrediente modificate genetic trebuie etichetate , dar în Statele Unite , o astfel de etichetare nu este obligatorie în prezent , iar alimentele care conțin mai puțin de cinci procente organisme modificate genetic (OMG) pot fi etichetate ca fiind fără OMG . Cu toate acestea , alimentele certificate ca fiind organice conform standardelor Departamentului Agriculturii din SUA trebuie să fie fără OMG .

Preocupările legate de mediu se referă, în general, la riscurile prezentate de eliberarea organismelor modificate genetic în mediu. Aceste riscuri includ transferul potențial de gene prin încrucișarea cu plante sălbatice, toxicitatea și natura invazivă a plantei modificate , ceea ce ar putea duce la dispariția speciilor naturale (pierderea biodiversității). Deși studiile de laborator și de teren sugerează că polenizarea...

Polenizarea încrucișată și transferul de gene pot avea loc între unele plante modificate genetic și rudele lor sălbatice, dar există puține dovezi că acest lucru s-a întâmplat în natură. Dacă, de exemplu, rezistența la glifosat ar fi transferată de la plante cultivate, cum ar fi rapița, la rudele lor sălbatice, buruienile rezistente la erbicide ar putea face în cele din urmă tratamentul cu erbicide ineficient. Companiile de biotehnologie au modificat plante transgenice pentru a produce forme sterile care nu își pot transfera genele la alte plante. Sterilitatea încorporată a fost, de asemenea, dezvoltată pentru a se asigura că fermierii nu își pot produce propriile semințe din culturi modificate genetic, garantând astfel companiilor de biotehnologie distribuția exclusivă a semințelor în fiecare an. Acest lucru, la rândul său, ridică o altă problemă etică, în special în țările în curs de dezvoltare, care au resurse limitate pentru a achiziționa semințe modificate genetic.

Testarea genetică și dilemele etice

Când a fost discutat pentru prima dată despre Proiectul Genomului Uman , oamenii de știință și publicul larg și-au exprimat o serie de îngrijorări cu privire la modul în care vor fi utilizate informațiile genomice și la modul în care ar putea fi protejate interesele atât ale indivizilor, cât și ale societății . Pentru a aborda aceste probleme, a fost lansat Programul Implicații Etice, Legale și Sociale (ELSI *)* ca o completare a Proiectului Genomului Uman. Programul ELSI ia în considerare o serie de aspecte, inclusiv impactul informațiilor genetice asupra indivizilor, confidențialitatea informațiilor genetice și implicațiile pentru practica medicală, consilierea genetică și luarea deciziilor privind reproducerea. Prin finanțare pentru cercetare , seminarii și prelegeri publice, ELSI dezvoltă o serie de politici alternative pentru a aborda aceste probleme.

ELSI se concentrează pe patru domenii în cadrul deliberărilor sale cu privire la acest set de probleme: (1) confidențialitatea și corectitudinea în utilizarea și interpretarea informațiilor genetice, (2) modalități de transfer al cunoștințelor genetice din laboratorul de cercetare în practica clinică, (3) modalități de a asigura că participanții la cercetarea genetică sunt conștienți și înțeleg riscurile și beneficiile potențiale ale participării lor și își oferă consimțământul informat și (4) educarea publicului și a profesioniștilor. Se speră că - pe măsură ce Proiectul Genomului Uman trece de la generarea de informații despre baza genetică a bolilor la îmbunătățirea tratamentelor, promovarea prevenirii și dezvoltarea de leacuri - aceste și alte preocupări etice vor fi examinate temeinic și se va ajunge la un consens internațional cu privire la politicile și normele juridice adecvate .

Multe dintre potențialele beneficii și consecințe ale testării genetice nu sunt întotdeauna clare. De exemplu :

- Avem tehnologia necesară pentru a detecta bolile genetice pentru care nu există tratamente eficiente . Dar *ar trebui să* supunem oamenii testelor pentru aceste boli?
- Cu tehnologiile actuale de testare genetică , un rezultat negativ nu exclude neapărat dezvoltarea viitoare a unei boli; nici un rezultat pozitiv nu înseamnă întotdeauna că o persoană va dezvolta boala. Cum putem comunica eficient rezultatele testelor și riscurile reale pentru persoanele care se supun acestor teste?
- Ce informații ar trebui să aibă oamenii înainte de a decide să se supună screeningului genomic sau testării genetice pentru o anumită boală?
- Cum putem proteja informațiile furnizate de rezultatele acelor teste?
- Întrucât partajarea datelor pacienților prin intermediul dosarelor electronice de sănătate provoacă îngrijorări - semnificative , ce mecanisme de consimțământ trebuie să luăm în considerare?
- Cum putem defini și preveni discriminarea genetică ?

Anterior în acest capitol, am discutat despre diagnosticul genetic preimplantațional (PGD), care oferă cuplurilor oportunitatea de a analiza embrionii creați prin fertilizare *in vitro* . în căutarea bolilor genetice . Pe măsură ce aflăm mai multe despre genele implicate în trăsăturile umane, va fi utilizat diagnosticul prenatal (PGD) pentru a detecta alte gene care nu au legătură cu bolile? Vor avea cuplurile opțiunea de a selecta embrioni cu anumite gene care codifică trăsături dezirabile specifice legate de înălțime, greutate, intelect sau alte caracteristici fizice sau mentale? Ce părere aveți despre utilizarea testelor genetice pentru a selecta în mod deliberat un embrion cu o tulburare genetică ? Recent , au existat mai multe cazuri raportate pe scară largă de cupluri care au dorit să utilizeze diagnosticul prenatal sau tehnicile PGD pentru a selecta embrioni cu nanism și surditate.

Pe măsură ce identificarea trăsăturilor genetice devine mai rutină în mediile clinice, medicii vor trebui să asigure confidențialitatea genetică a pacienților lor. Există o îngrijorare semnificativă cu privire la modul în care informațiile genetice ar putea fi utilizate în mod abuziv .

de către companii , companii de asigurări , agenții guvernamentale sau publicul larg. Confidențialitatea genetică și prevenirea discriminării genetice vor deveni din ce în ce mai importante în următorii ani. În prezent, nu există nicio lege federală în Statele Unite privind confidențialitatea genetică și discriminarea genetică, așa că oamenii trebuie să se bazeze pe buna -credință a celor cu care au de-a face. În 2008, Legea privind nediscriminarea informațiilor genetice a fost adoptată în Statele Unite . Această legislație este concepută pentru a interzice utilizarea abuzivă a informațiilor genetice în procesele de angajare și în polițele de asigurare de viață.

Testarea genetică direct către consumator și reglementarea companiilor care furnizează servicii de testare genetică

, am văzut evoluții extraordinare în așa-numita testare genetică directă către consumator (DTC). O simplă căutare pe web va dezvălui numeroase companii care oferă testare genetică DTC. Astfel de teste sunt disponibile acum pentru aproximativ 1.900 de boli (față de aproximativ 100 în 1993). Majoritatea testelor DTC necesită ca persoana care efectuează testul să trimită prin poștă o mostră de salivă , o mostră de păr sau un tampon bucal companiei de testare . Serviciile oferite variază ca preț, iar companiile de testare DTC utilizează de obicei tehnici bazate pe SNP, cum ar fi testele ASO, pentru a detecta diferite mutații. De exemplu, în 2007, Myriad Genetics, Inc. a lansat o campanie majoră de marketing pentru testele sale *BRCA1* și BRCA2 . Mutațiile acestor gene cresc riscul de a dezvolta cancer mamar și ovarian. Companiile de testare DTC raportează riscul absolut, adică probabilitatea ca o persoană să dezvolte o boală, dar modul de calculare a acestor riscuri variază foarte mult de la o companie la alta și este supus anumitor presupuneri.

Aceste tipuri de teste sunt controversate din mai multe motive. De exemplu, testul este achiziționat online de către consumatori individuali și nu necesită participarea unui medic sau a oricărui alt profesionist din domeniul sănătății, cum ar fi o asistentă medicală sau un consilier genetic, în procesul de administrare sau interpretare a rezultatelor . Există îndoieli semnificative cu privire la calitatea, eficacitatea și acuratețea acestor produse, deoarece sectorul testării directe către consumator (DTC) este în prezent în mare parte autoreglementat. FDA din SUA nu a reglementat testele genetice DTC . Prin urmare, în prezent nu există o modalitate viabilă pentru pacienți de a compara și evalua gama de teste disponibile și calitatea lor relativă.

Majoritatea companiilor precizează clar că nu încearcă să diagnosticheze sau să prevină bolile și că nu oferă sfaturi medicale , așadar, care este scopul informațiilor pe care rezultatele acestor teste le oferă consumatorului ?

Site-urile web și programele online de testare DTC oferă informații despre consilierea pe care o persoană ar trebui să o solicite dacă primește rezultate pozitive . Dar este oare suficient acest lucru ? Dacă rezultatele nu sunt pe deplin înțelese , ar putea rezultatele negative ale testelor să ofere un fals sentiment de -*siguranță* ? O femeie care pur și simplu testează negativ pentru mutațiile BRCA1 . Și faptul că ai *BRCA2 nu înseamnă* că nu poți dezvolta cancer la sân sau la ovare.

În iunie 2010 , FDA a anunțat că cinci producători de teste genetice (Illumina, Pathway Genomics, Navi- Genics, 23andMe și deCODE Genetics) vor trebui să obțină aprobarea înainte de a-și vinde testele către consumatori. Această mișcare a fost determinată de anunțul Pathway Genomics privind planurile de a comercializa un kit de „genotipare cuprinzătoare" direct către consumator (DTC) în farmaciile Walgreens . Pathway Genomics și celelalte companii își vindeau testele DTC prin intermediul site-urilor lor web respective de câțiva ani. Pathway și celelalte companii au susținut că nu este necesară nicio reglementare suplimentară , deoarece kiturile lor DTC au fost aprobate în temeiul Amendamentelor privind Îmbunătățirea Laboratorului Clinic (CLIA) . Acest regulament guvernează anumite teste , dar nu se află sub jurisdicția FDA. Această situație particulară a stârnit discuții despre modul în care FDA ar trebui să reglementeze testele genetice DTC . Cu toate acestea , la momentul acestei publicări , FDA nu prezentase niciun plan definitiv de reglementare sau controlare a testelor DTC . Există opinii diverse cu privire la problema reglementării legale . Unii -consideră că FDA nu ar trebui să reglementeze testele DTC și că consumatorii ar trebui să fie liberi să achiziționeze produse în funcție de propriile nevoi sau interese. Alții insistă că FDA trebuie să reglementeze testele DTC pentru a proteja în mod adecvat consumatorii .

În 2010, Institutele Naționale de Sănătate au anunțat crearea unui Registru de Testare Genetică (GTR) conceput pentru a crește transparența prin partajarea publică a informațiilor despre utilitatea testelor genetice și punerea la dispoziția publicului larg , pacienților, profesioniștilor din domeniul sănătății, consilierilor genetici

, companiilor de asigurări și altor părți interesate a rezultatelor acestor investigații . Acest registru își propune să ofere persoanelor și familiilor resurse esențiale pentru a lua decizii mai informate cu privire la sănătatea și testarea lor genetică. Cu toate acestea, participarea la acest registru de către companiile care comercializează teste directe către consumator (DTC) nu este încă obligatorie, așa că întrebarea rămâne: vor participa companiile care efectuează teste genetice ?

Probleme etice legate de terapia genică

Terapia genică ridică mai multe probleme etice, iar multe tipuri de terapie genică generează dezbateri intense. În prezent , toate studiile clinice privind terapiile genice sunt limitate la utilizarea celulelor somatice ca ținte pentru transferul de gene. Această formă de terapie genică se numește terapie genică somatică; este afectată o singură persoană , iar terapia este efectuată cu permisiunea pacientului sau a familiei sale, care trebuie să își dea consimțământul în cunoștință de cauză.

Există alte două forme de terapie genică care nu au fost aprobate, în principal din cauza problemelor etice nerezolvate pe care le ridică. Prima se numește terapie germinală, o tehnică ce utilizează celulele germinale (celulele care dau naștere gameților, adică spermatozoizii și ovulele) ca ținte pentru transferul de gene . Prin intermediul acestei tehnici, gena transferată este încorporată în toate celulele viitoare ale corpului, inclusiv în celulele germinale. Aceasta înseamnă că persoanele din generațiile viitoare vor fi, de asemenea, afectate fără consimțământul lor. Este acest tip de procedură etică? Avem dreptul să luăm astfel de decizii în numele generațiilor viitoare? Până în prezent, problemele au depășit potențialele beneficii, iar astfel de cercetări sunt interzise.

A doua formă neaprobată de terapie genică – care prezintă o dilemă etică și mai mare – se numește terapie genică de amplificare, care permite „îmbunătățirea" trăsăturilor dorite la oameni. Această utilizare a terapiei genice este extrem de controversată și mulți oameni i se opun vehement. Ar trebui utilizată tehnologia genetică pentru a spori potențialul uman? De exemplu, ar trebui permisă terapia genică pentru creșterea înălțimii, îmbunătățirea abilităților atletice sau sporirea potențialului intelectual? În prezent, consensul este că terapia de amplificare , la fel ca terapia germinală , constituie o utilizare inacceptabilă a tehnicilor de terapie genică. Cu toate acestea, dezbaterea este în curs de desfășurare și multe întrebări rămân fără răspuns. De exemplu, FDA permite acum utilizarea hormonului de creștere produs folosind tehnologia ADN recombinant ca amplificator de creștere, pe lângă faptul că permite utilizarea sa medicală pentru tratamentul tulburărilor genetice de - creștere . Criticii susțin că utilizarea unui produs modificat genetic în scopuri de reproducere va duce în cele din urmă la utilizarea genelor transferate genetic în exact același scop. Rezultatul acestor dezbateri ar putea afecta nu numai soarta indivizilor , ci și direcția în care se îndreaptă societatea noastră însăși.

Brevete ADN și gene

Drepturile de proprietate intelectuală sunt, de asemenea , subiectul unor dezbateri aprofundate , ca parte a implicațiilor etice ale ingineriei genetice , genomicii și biotehnologiei . Brevetele de proprietate intelectuală (gene izolate , structuri genetice noi, tipuri de celule recombinante, organisme modificate genetic) pot fi potențial lucrative pentru deținătorii lor, dar pot ridica și probleme etice și științifice . De ce este importantă protejarea proprietății intelectuale pentru afaceri ? Luați în considerare următoarea problemă : Dacă o companie este dispusă să investească milioane sau miliarde de dolari și câțiva ani în cercetare și dezvoltare (C&D) pentru a obține un produs valoros, nu ar trebui să acordăm acelei companii o perioadă de timp pentru a-și proteja descoperirea, astfel încât să își poată recupera costurile de C&D și să profite de pe urma produsului său ?

Genele în starea lor naturală, ca produse ale naturii, nu pot fi brevetate . Luați în considerare posibilitățile care ar apărea dacă oamenii de știință ar clona o genă umană și apoi ar breveta-o. Persoana sau compania care deține brevetul ar putea cere ca oricine încearcă să efectueze cercetări cu gena brevetată să îi plătească o taxă de licență pentru utilizarea acesteia. Dacă cercetarea ar duce la un test de diagnostic sau la o terapie, ar putea fi cerute licențe și redevențe suplimentare și, prin urmare , costul testării genetice ar putea deveni prea mare pentru mulți pacienți. Însă limitarea sau împiedicarea brevetării genelor sau a instrumentelor genetice ar putea, pe de altă parte , să reducă stimulentele pentru efectuarea cercetărilor care duc la dezvoltarea acelor gene și instrumente, în special pentru companiile care trebuie să profite de pe urma cercetării lor . Ar trebui ca oamenii de știință din companii să aibă voie să breveteze secvențe de ADN corespunzătoare organismelor vii din natură? Și ar trebui să existe o limită inferioară sau superioară a dimensiunii acestor secvențe ? De exemplu, ar trebui acordate brevete pentru fragmente mici de gene, cum ar fi markerii de secvență exprimați ?

Proiecte genomice personale și cursa pentru obținerea unui genom pentru un 1.000 de dolari

Secvențierea întregului genom uman a fost necesară în cadrul Proiectului Genomului Uman, în cadrul căreia s-a realizat un proiect internațional ambițios, care a furnizat secvența de nucleotide a celor 3 miliarde de perechi de baze de ADN care alcătuiesc genomul uman. Secvența de referință creată de Proiectul Genomului Uman nu a fost derivată din ADN-ul unei singure persoane , ci dintr -un compozit de probe de ADN de la numeroși donatori anonimi.

Când Proiectul Genomului Uman a fost finalizat, obiectivul secvențierii în mod curent a genomurilor unor persoane individuale părea foarte îndepărtat. Cu toate acestea , dezvoltarea tehnologiilor de secvențiere de mare randament, capabile să genereze citiri de secvențe lungi la viteză mare și cu o precizie ridicată , a redus drastic costul secvențierii ADN-ului . Așa cum s-a menționat în Capitolul 21, cursa pentru secvențierea întregului genom uman pentru doar 1.000 de dolari a început .

Obiectivul secvențierii genomurilor pentru 1.000 de dolari este pe cale să devină realitate. În 2009, profesorul Stephen Quake de la Universitatea Stanford a anunțat că și-a secvențiat întregul genom în câteva săptămâni pentru mai puțin de 50.000 de dolari, folosind o nouă tehnologie de secvențiere și un singur aparat . În 2010, două companii din California , Illumina și Life Technologies, au început să vândă instrumente de secvențiere capabile să - secvențieze un genom uman într- o singură zi pentru mai puțin de 6.000 de dolari .

Pe măsură ce ne apropiem de obiectivul secvențierii unui genom pentru 1.000 de dolari, oamenii de știință fac deja planuri pentru proiecte și mai ambițioase . Un consorțiu internațional de cercetare a lansat Proiectul 1000 de Genomuri, care își propune să secvențieze genomurile a 1.000 de voluntari din medii diverse, inclusiv persoane de origine africană, asiatică și europeană. Scopul este de a produce un catalog cuprinzător al variațiilor secvențelor de ADN uman . George Church de la Universitatea Harvard și colaboratorii săi au lansat Proiectul Genomului Personal - un proiect care își propune să secvențieze genomurile a 100.000 de indivizi. Voluntarii din cadrul Proiectului Genomului Personal trebuie să furnizeze - mostrele lor de ADN cu înțelegerea că datele lor genomice vor fi disponibile publicului . Genomul lui Church este deja disponibil online . Proiectul își propune să coreleze secvențele genomice cu caracteristicile fenotipice , de la înălțime și culoarea părului până la predispoziția la boli .

Cursa continuă să reducă costurile și timpul necesare pentru secvențierea unui genom individual . Fie că ne place sau nu , intrăm în era genomicii personale .

Rândul tău

1. Ți-ai secvența genomului dacă prețul ar fi rezonabil ? De ce?

Puteți găsi o discuție despre avantajele și dezavantajele cunoașterii propriei secvențe genomice într- o serie de articole intitulate „ **Genomul meu** *. Și ce dacă?” (Nature* **456: 1,** 2008).

2. Ați pune secvența genomului - dumneavoastră la dispoziția publicului larg ? Ce utilizări greșite ar putea fi făcute cu aceste informații?

Problema confidențialității genetice este deosebit de importantă atunci când se are în vedere punerea la dispoziția publicului a secvențelor genomice . Puteți citi despre potențialele utilizări și abuzuri ale secvențelor genomice în: Taylor , **P. 2008. When consent - gets way .** *Nature* **456:32-33.**

3. Ce tipuri de informații credeți că ați putea obține examinând propria secvență genomică ?

secvența ADN și fenotipurile previzibile rămâne destul de opacă. Puteți citi despre acest lucru în **Maher, B. 2008. Genomuri personale: cazul ereditabilității lipsă .** *Nature* **456: 18-21.**

4. Astăzi , există companii private care oferă deja servicii de secvențiere a genomului personal , împreună cu interpretarea corespunzătoare . Ce servicii oferă acestea? Credeți că aceste servicii ar trebui reglementate și, dacă da , cum ?

Puteți obține informații despre una dintre aceste companii, 2 3a nd Me, la **http://www.23andMe.com** *. Puteți citi despre avantajele și dezavantajele companiilor de secvențiere directă către* **consumator în Ng, PC și colab. 2010. „** *An agenda for* **personalized medicine ” . Nature 461 :** *724-726* **.**

(EST), doar pentru că o persoană sau o companie dorește să solicite despăgubiri pentru că a clonat un fragment de ADN pentru prima dată, chiar dacă nimeni nu știe dacă acea secvență de ADN are vreo utilitate? Ar trebui să li se permită cercetătorilor să breveteze întregul genom al oricărui organism pe care l-au secvențiat?

Până în prezent, Oficiul pentru Brevete și Mărci din Statele Unite a acordat brevete pentru peste 35.000 de gene sau secvențe genetice , inclusiv

aproximativ 20% din genele umane. (De altfel, brevetele pentru gene umane i-au determinat pe unii să folosească termenul *„patent-mal".)* Unii oameni de știință sunt îngrijorați de faptul că acordarea unui brevet doar pentru clonarea unui fragment de ADN înseamnă, în esență , acordarea unui brevet pentru ceva ce necesită foarte puțin efort. Întrucât computerele gestionează cea mai mare parte a activității de rutină a secvențierii genomului, cine ar trebui să obțină brevetul ? Dar persoanele care reușesc să descopere *ce să facă* cu gena? Ce se întâmplă dacă acea secvență genetică joacă un rol într-o boală pentru care ar putea fi dezvoltată terapia genică? Mulți oameni de știință consideră că este mai potrivit să se breveteze noile tehnologii și aplicații care utilizează secvențe genetice, decât secvențele genetice în sine.

Congresul SUA are în vedere o legislație care ar interzice brevetele asupra genelor umane și a oricăror secvențe, funcții sau corelații cu produse genetice naturale. Brevetele privind testele genetice sunt, de asemenea, supuse unei analize intense , în parte din cauza îngrijorărilor că un test brevetat ar putea crea monopoluri , împiedicând pacienții să obțină o a doua opinie dacă o singură companie are dreptul de a efectua un anumit test genetic. Analize recente estimează că 64 % din brevetele privind testele pentru detectarea genelor legate de boli fac foarte dificilă sau imposibilă propunerea unei alternative de către alte grupuri.

În 2010, un caz istoric intentat de Uniunea Americană pentru Libertăți Civile împotriva Myriad Genetics a susținut că Myriad nu putea breveta secvențele *BRCA1* și *BRCA2 utilizate pentru diagnosticarea* cancerului de sân . Un judecător districtual din SUA a decis că brevetele Myriad erau invalide , argumentând că ADN-ul în forma sa izolată nu este fundamental diferit de ADN-ul corespunzător găsit în organism. Myriad a pierdut procesul și a fost acuzată că își monopolizează testele, care sunt disponibile de peste un deceniu sub licențe exclusive din SUA .

Brevete și biologie sintetică

Institutul J. Craig Venter (JCVI) a depus două cereri de brevet pentru ceea ce numește „ prima formă de viață creată de om din lume ". Brevetele urmăresc să acopere genomul minimal al *M. genitalium,* despre care JCVI consideră că conține genele esențiale pentru auto - replicare. Una dintre aceste cereri de brevet este formulată ca solicitând drepturi asupra unor organisme construite sintetic . Un alt brevet, acordat recent în Statele Unite unui alt grup de cercetători, acoperă aplicarea unui genom minimal al *E. coli.* Acest lucru a generat și mai multă îngrijorare , având în vedere importanța sa relativă mai mare în comparație cu M. *genitalium.* Ce părere aveți? Ar trebui să fie posibilă brevetarea unui genom minimal sau a unui organism sintetic?

STUDIU DE CAZ | Timpul este ȘI toate

În 1990, o tânără născută fără un sistem imunitar funcțional a devenit prima persoană care a urmat terapiei genice. Într - o încercare de a -i trata tulburarea autosomal recesivă, cunoscută sub numele de imunodeficiență combinată severă (SCID), copii ale genei care codifică enzima lipsă (adenozin deaminază sau ADA) au fost inserate în unele dintre leucocitele sale ; aceste leucocite au fost apoi injectate înapoi în fluxul sanguin . Expresia alelei ADA normale a dus la dezvoltarea unui sistem imunitar funcțional, permițând tinerei să trăiască o viață normală fără a fi nevoie să fie testată pentru aceeași boală .

o viață normală. Înțelegerea acestui succes spectaculos necesită cunoașterea mai multor detalii ale procesului:

1. Este important ca gena clonată să devină parte a unui cromozom atunci când este introdusă într -o celulă ?
2. Gena clonată înlocuiește copia defectă a genei ADA?
3. De ce au fost alese leucocitele ca ținte pentru genele transferate?
4. Credeți că producerea a 50% din nivelurile normale de ADA este suficientă pentru a restabili funcția imunitară ?

Puncte de rezumat

1. Tehnologia ADN-ului recombinant poate fi utilizată pentru fabricarea de produse proteice biofarmaceutice valoroase, cum ar fi proteinele terapeutice destinate tratării bolilor.
2. Plantele modificate genetic, concepute pentru a crește productivitatea și valoarea nutritivă a culturilor, precum și pentru a îmbunătăți rezistența la erbicide , dăunători și condiții meteorologice nefavorabile, devin răspândite în întreaga lume.
3. cu caracteristici de creștere îmbunătățite sau cu anumite fenotipuri dorite

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare , vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

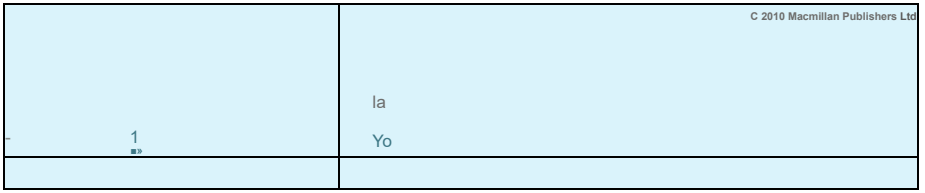
sunt create prin inginerie genetică pentru o gamă largă de aplicații.

4. Interesul pentru biologia sintetică și potențialele sale aplicații a fost stârnit odată cu crearea unui genom sintetic, care a fost utilizat cu succes într - un experiment de transplant de genom la bacterii.
5. Diverse tehnici moleculare pot fi utilizate pentru a identifica - polimorfismele asociate atât cu fenotipuri normale, cât și cu cele corespunzătoare diferitelor boli ; aceste tehnici moleculare includ analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție, testele de oligonucleotide specifice alelelor și cipurile ADN .
6. Studiile de asociere la nivelul întregului genom pot dezvălui variații genetice legate de anumite boli în cadrul unor populații specifice.
7. Farmacogenomica oferă baza pentru tratament medical personalizat, bazat pe genotipul fiecărei persoane.
8. Terapia genică implică administrarea de gene terapeutice sau inhibarea expresiei genelor defecte , pentru a trata tulburări genetice.
9. Aplicațiile ingineriei genetice și biotehnologiei ridică o serie de dileme etice, sociale și juridice, cu implicații științifice și sociale importante.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. studiu recent realizat de Petukhova și colab. (Studiul de asociere la nivelul întregului genom în alopecia areata implică atât imunitatea - înnăscută , cât și cea adaptivă , *Nature 466:113-117, 2010) a implicat* un studiu de asociere la nivelul întregului genom care a analizat 1.054 de cazuri de pacienți cu alopecia areata (AA) și 3.278 de indivizi din grupul de control. Alopecia areata este o boală care provoacă o pierdere semnificativă a părului și afectează aproximativ 5,3 milioane de persoane numai în Statele Unite.

   (a) Următorul grafic al Manhattan-ului corespunzător studiului respectiv :



Poziția în genom

Interpretați acest grafic și precizați ce cromozomi au fost asociați cu loci care ar putea contribui la alopecia areata.

(b) Dintre cele 139 de SNP-uri asociate semnificativ cu alopecia areata , mai multe gene sunt implicate în controlul activării și proliferării limfocitelor T reglatoare (celule Treg) și a limfocitelor T citotoxice. Există, de asemenea, gene implicate în prezentarea antigenelor către celulele sistemului imunitar, molecule reglatoare ale sistemului imunitar, cum ar fi interleukinele, și gene exprimate chiar în foliculul de păr. Speculați asupra modului în care aceste gene candidate ar putea ajuta oamenii de știință să înțeleagă cum progresează alopecia areata.

Soluție

(a) Cercetătorii au identificat opt regiuni genomice cu polimorfisme SNP care au depășit valoarea de semnificație genomică de 5 x 10 (linia neagră). Aceste regiuni au fost grupate pe cromozomii 2, 4, 6, 9, 10, 11 și 12.

SIDA (Sindromul Imunodeficienței Dobândite). Mai exact , HIV infectează și distruge celulele sistemului imunitar care poartă un receptor de suprafață celulară cunoscut sub numele de CD4. O proteină de suprafață a HIV numită gp120 se leagă de receptorul CD4 și permite virusului să intre în celulă . Gena care codifică proteina CD4 a fost deja clonată. Cum poate fi utilizată această clonă, împreună cu tehnicile de ADN recombinant, pentru a combate infecția cu HIV?

Soluție

Cercetătorii speră că clonele genei *CD4* pot fi utilizate pentru a proiecta sisteme pentru administrarea țintită a medicamentelor și toxinelor destinate combaterii infecțiilor. De exemplu, deoarece infecția depinde de o interacțiune între proteina virală gpl20 și proteina CD4, gena *CD4* Gena clonată a fost modificată pentru a produce o formă solubilă a proteinei (sCD4) care, datorită solubilității sale, ar circula liber în tot

(b) Alopecia areata este o boală autoimună în care sistemul imunitar atacă foliculii de păr , provocând căderea părului care se poate răspândi pe scalp și chiar în tot corpul . În alopecia areata, foliculii de păr sunt atacați de celulele T. Identificarea genelor candidate implicate în proliferarea celulelor T , reglarea sistemului imunitar și dezvoltarea foliculară ar putea ajuta cercetătorii să dezvolte remedii pentru alopecia areata .

2. Infecția cu HIV-1 (virusul imunodeficienței umane) slăbește sistemul imunitar și provoacă simptomele de

corpul. Ideea este de a preveni infectarea celulelor de către HIV prin determinarea proteinei gpl20 a virusului să întâlnească și să se lege mai întâi de molecule suplimentare ale formei solubile a proteinei CD4 . Odată legat de aceste molecule suplimentare , virusul nu ar mai putea să se lege de proteinele CD4 existente pe suprafața celulelor sistemului imunitar . Studiile efectuate pe sisteme celulare cultivate indică faptul că prezența sCD4 previne eficient infecția cu HIV a celulelor tisulare cultivate . Cu toate acestea, studiile efectuate pe persoane seropozitive au fost oarecum descurajatoare, în principal pentru că tulpinile HIV utilizate în laborator sunt diferite de cele găsite la persoanele infectate. Într-o strategie diferită, gena *CD4 este* ... Aceasta a fuzionat cu gene care codifică toxine bacteriene. Proteina de fuziune rezultată conține regiuni CD4 care ar trebui să se lege de gp120 de pe suprafața celulelor infectate cu HIV , precum și regiuni toxice care ar trebui să distrugă celula infectată. În experimentele de cultură de țesuturi , celulele infectate cu HIV sunt distruse de această proteină de fuziune , în timp ce celulele neinfectate supraviețuiesc .

Problemas y preguntas para la discusión

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

DE CUM ȘTIM (

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra unui număr de aplicații interesante ale ingineriei genetice , genomicii și biotehnologiei . Pe parcursul procesului, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol , cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum putem stabili dacă plantele modificate genetic sunt sigure pentru consumul uman ?
   (b) Ce dovezi experimentale confirmă faptul că am introdus un gel util într-un organism transgenic și că acesta se comportă așa cum era anticipat?
   (c) analiza ADN-ului pentru a determina dacă un făt uman are anemie falciformă?
   (d) Cum putem folosi analiza cipurilor ADN pentru a identifica gene specifice care sunt exprimate într- un anumit țesut?
   (e) Cum se efectuează studiile de asociere la nivelul întregului genom și ce informații oferă acestea?
   (f) Care sunt unele dintre motivele tehnice pentru care terapiile genice sunt dificil de implementat eficient ?
2. Enumerați câteva dintre motivele pentru care culturile modificate genetic sunt controversate . Descrieți câteva dintre principalele preocupări legate de alimentele modificate genetic .
3. Credeți că guvernele ar trebui să impună etichetarea tuturor alimentelor care conțin organisme modificate genetic ? Explicați răspunsul .
4. Gena insulinei umane conține introni. Întrucât celulele bacteriene nu ar elimina intronii din ARNm, cum poate fi clonată o genă ca aceasta într-o celulă bacteriană și să producă insulină?
5. Una dintre principalele probleme de siguranță asociate cu culturile modificate genetic este potențiala lor alergenicitate, cauzată de introducerea unui alergen sau de o modificare a nivelului de expresie al unui alergen gazdă . Având în vedere că proteinele alergenice comune conțin adesea fragmente identice din doar câțiva aminoacizi (șase sau șapte), cercetătorii au dezvoltat o metodă de a examina culturile transgenice și de a evalua potențialele lor proprietăți alergenice (Kleter & Peijnenburg , 2002. *BMC Struct. Biol. 2:* 8). Cum credeți că au realizat acest lucru ?
6. De ce sunt majoritatea proteinelor umane recombinante produse în gazde animale sau vegetale , mai degrabă decât în celule gazdă bacteriene?
7. În Statele Unite, există peste 1.000 de animale de fermă clonate . În viitorul apropiat, laptele provenit de la vacile clonate și de la urmașii lor concepuți pe cale naturală ar putea deveni disponibil în supermarketuri. Aceste animale clonate nu au fost modificate genetic; ele nu sunt diferite de gemenii identici . Ar trebui laptele provenit de la aceste animale și de la urmașii lor concepuți pe cale naturală să fie etichetat ca provenind de la vaci clonate sau de la urmașii lor? De ce ?
8. Una dintre principalele cauze ale bolilor, deceselor și pierderilor economice în industria zootehnică este *Mannheimia hemolytica*. care provoacă pasteureloză bovină (febra navelor). Administrarea neinvazivă a unui vaccin utilizând plante transgenice care exprimă imunogeni ar reduce costurile cu forța de muncă și traumatismele aduse animalelor . Un prim pas în dezvoltarea unui vaccin comestibil este de a determina dacă o versiune injectabilă a antigenului (de obicei un derivat al agentului patogen) este capabilă să stimuleze dezvoltarea de anticorpi într -un - organism testat. Tabelul de mai jos evaluează capacitatea unei porțiuni transgenice *a* unei toxine (Lkt) de la *M.* henwlitica de a stimula dezvoltarea de anticorpi specifici la iepuri .
   (a) Ce concluzii generale se pot trage din aceste date?
   (b) În ceea ce privește dezvoltarea unui vaccin comestibil utilizabil , ce mai sunt de făcut ?

Imunogen injectat	Producția de anticorpi în ser
Lkt50*—extract salin	4-
Lkt50—extras de coloană	+
Injecție placebo Pre-injecție	—

• Lkt50 este un derivat mai mic al Lkt căruia îi lipsesc regiunile hidrofobe. - indică o neutralizare de cel puțin 50% a toxicității Lkt; - indică lipsa activității de neutralizare.
***Sursă:* tabel modificat după Lee și colab. 2001. *Infect and Immunity* 69: 5786-5793.**

9. J. Craig Venter un genom sintetic . Cum au demonstrat că genomul a transformat tulpina bacteriană receptoare într-o tulpină diferită?
10. Să presupunem că dezvoltați o metodă de detectare a fibrozei chistice care identifică mutația *A508* predominantă și celelalte șase mutații cele mai prevalente. Ce trebuie să luăm în considerare înainte de a utiliza această metodă pentru a depista o populație pentru această boală?
11. Secvențierea genomului uman și dezvoltarea tehnologiei cipurilor ADN promit să ne îmbunătățească înțelegerea comportamentului celular normal și anormal . În ce moduri schimbă tehnologia cipurilor ADN înțelegerea noastră asupra bolilor complexe, cum ar fi cancerul?
12. Un cuplu de origine europeană solicită consiliere genetică înainte de a avea copii, deoarece există antecedente familiale de fibroză chistică în familia soțului. Testul ASO pentru fibroză chistică arată că soțul este heterozigot pentru mutația *S508* , iar soția este heterozigotă pentru mutația R117. Imaginați-vă că sunteți consilierul genetic . La întâlnirea cu dumneavoastră, cuplul își exprimă convingerea că nu prezintă riscul de a avea un copil afectat, deoarece fiecare dintre ei poartă o mutație diferită și nu pot avea un copil care să fie homozigot pentru niciuna dintre ele . Ce le -ați spune ?
13. tehnologiile de screening genomic devin comune , dosarele medicale vor conține rezultatele acestor teste. Cine ar trebui să aibă acces la aceste informații? Ar trebui ca angajatorii, potențialii angajatori sau companiile de asigurări să aibă acces? Ați fi de acord sau nu cu ideea ca guvernul să înființeze și să mențină o bază de date centrală care să conțină rezultatele screeningului genomic pentru toți membrii populației ?
14. Ce limitează utilizarea diferențelor în situsurile enzimelor de restricție ca modalitate de detectare a mutațiilor punctuale la oameni ?
15. studiilor de asociere la nivelul întregului genom ? Cum pot fi utilizate rezultatele acestor studii pentru a informa oamenii de știință și medicii despre bolile genetice ?
16. Adenovirusurile recombinante au fost utilizate în numeroase studii preclinice pentru a determina eficacitatea terapiilor genice pentru artrita reumatoidă și osteoartrita. Genele pot fi administrate prin injecție în țesuturile care au nevoie de ele. Christopher Evans și colegii săi (2001. *Arthritis Res.* 3: 142-146) au estimat că aproximativ 20 % din toate studiile de terapie genică la om au utilizat adenovirusuri pentru administrarea de gene . Decesul unui pacient în 1999 în urma injectării cu vectori adenovirali a stârnit îngrijorări. Luați în considerare utilizarea vectorilor virali ca vehicule de administrare pentru boli umane valoroase din punct de vedere terapeutic . Ce factori par a fi cei mai îngrijorători?
17. Definiți conceptele de terapie genică somatică, terapie germinală și terapie genică de amplificare. Care dintre aceste tipuri de terapie sunt utilizate în prezent?
18. Oferiți exemple ale principalelor obstacole care trebuie depășite pentru ca terapia genică să devină un tratament sigur și viabil pentru bolile genetice .
19. *Țintirea transducțională* este o abordare preferată pentru administrarea agenților terapeutici în bolile umane. Aceasta implică dezvoltarea de interacțiuni specifice țesuturilor între un vector viral și un anumit țesut. O abordare genetică care a fost utilizată implică modificarea capsidei unui virus adeno-asociat (tipul 2) pentru a viza anumite tipuri de celule umane . Sunt posibile și tehnici non - genetice . Discutați problemele asociate cu tehnica genetică de modificare a capsidei și problemele care ar putea fi asociate cu tehnicile non-genetice de direcționare transducțională .
20. Dezvoltarea de vectori siguri pentru terapia genică la om a fost un obiectiv al cercetătorilor încă din 1990. Printre problemele asociate cu vectorii bazați pe virusuri se numără faptul că mulți virusuri (de exemplu, SV40) au proprietăți de transformare despre care se crede că sunt mediate de legarea și inactivarea produselor genetice, cum ar fi p53, proteina retinoblastomului (pRB) și altele. Au fost dezvoltați vectori bazați pe SV40 care sunt deficienți în legarea la p53, pRB și alte proteine. De ce am dori în mod specific să evităm inactivarea p53, pRB și a proteinelor înrudite ?
21. Mutațiile dominante pot fi clasificate în funcție de creșterea sau scăderea activității generale a unei gene sau a unui produs genetic . Deși o mutație cu pierdere de funcție (adică o mutație care inactivează produsul genetic) este în mod normal recesivă, pentru unele gene, o singură doză din produsul genetic normal, codificată de alela normală, este insuficientă pentru a produce un fenotip normal . În acest caz, o mutație cu pierdere de funcție a genei va fi dominantă, iar gena se spune că este *haploinsuficientă*. O a doua clasă de mutații dominante sunt mutațiile de tip „ câștig de funcție ”, care au ca rezultat o activitate sau o expresie nouă sau crescută a unei gene sau a unui produs genic . Tehnica de terapie genică utilizată în prezent în studiile clinice implică „adăugarea” unei copii normale a unei gene la celulele somatice. Cu alte cuvinte, o copie normală a genei este inserată în genomul celulei somatice mutante , dar copia mutantă a genei nu este nici îndepărtată , nici înlocuită. Va funcționa această strategie pentru cele două tipuri de mutații menționate ?
22. La șoarecii transfectați cu gena β-globinei de iepure, gena șoarecelui este activă în mai multe țesuturi, inclusiv splina , creierul și rinichii. În plus, unii șoareci transfectați dezvoltă talasemie (o formă de anemie) cauzată de un dezechilibru în producția coordonată de α- și β-globine. Ce probleme asociate cu terapia genică sunt ilustrate de aceste descoperiri?
23. Registrul de Testare Genetică își propune să ofere informații mai bune pacienților , însă companiile din sectorul testelor genetice nu sunt obligate să participe. Ar trebui ca participarea să fie obligatorie pentru aceste companii? De ce ? Explicați răspunsul.
24. Ar trebui guvernele să reglementeze testarea genetică direcționată către consumatori sau aceste teste ar trebui să fie disponibile ca produse pe care cumpărătorul le achiziționează pe propriul risc?

Probleme picante n ___

25. Gazdele mamifere transgenice sunt adesea produse prin injectarea de ADN transgenic într -un pronucleu, un proces laborios , complex din punct de vedere tehnic și, de obicei, nereușit în peste 1 % din cazuri . Recent , un retrovirus, lentivirusul modificat , a fost utilizat pentru a genera porci, șobolani, șoareci și vaci transgenici cu o eficiență care depășește 10 % (Whitelaw, 2004). Lentivectorii au activitate de transcriptază inversă, pot infecta atât celulele în diviziune , cât și pe cele care nu se divid și nu se replică. Folosind un lentivector care poartă o genă reporter care codifică o proteină fluorescentă verde, a fost produsă o gamă impresionantă de porci (vezi figura de deschidere a capitolului). Prezentați, într-o diagramă, o strategie pentru producerea unui mamifer transgenic care poartă o genă importantă din punct de vedere farmacologic folosind un lentivector.
26. Yeager, M. și colab. *(Nature Genetics)* 39:645-649, 2007) și Sladek, R. și colab . *(Nature* 445: 881-885 , 2007) au utilizat polimorfisme cu un singur nucleotid (SNP) în studii de asociere la nivelul întregului genom pentru a identifica noi loci de risc pentru cancerul de prostată și , respectiv , diabetul zaharat de tip 2. Ambele studii sugerează că se pot identifica gene asociate cu riscul de boală care contribuie semnificativ la dezvoltarea bolii . Având în vedere ceea ce știm despre aceste boli complexe, ce factori considerați că ar fi rezonabili la interpretarea rezultatelor studiilor de asociere la nivelul întregului genom ?
27. În martie 2010 , judecătorul R. Sweet a decis să invalideze brevetele Myriad Genetics pentru genele *BRCA1* . și *BRCA2.* Dulce

Pentru a consulta problemele și tutorialele atribuite de profesor, **vă rugăm** *să vizitați www.masteringgenetics.com*

El a scris că, deoarece genele fac parte din lumea naturală , acestea nu sunt brevetabile. Myriad Genetics deține, de asemenea, brevete pentru dezvoltarea unui test direct către consumator pentru genele *BRCA1* . și *BRCA2.*

(a) Sunteți de acord cu decizia judecătorului Sweet de a invalida brevetul pentru genele *BRCA1* ? și *BRCA2?* Dacă vi s-ar cere *să* evaluați brevetul pentru testarea directă la consumator pentru genele BRCA1 și *BRCA2,* Care ar fi decizia ta?

(b) J. Craig Venter a solicitat un brevet pentru „prima sa formă de viață creată de om ". Acest brevet este conceput pentru a acoperi genomul M. *genitalium. Ar* diferi decizia dumneavoastră cu privire la „organismul" lui Venter de decizia judecătorului Sweet cu privire la brevetul genei *BRCA1* ? și *BRCA21*

28. Există mai multe modele de șoareci pentru fibroza chistică umană . Fiecare dintre aceste tulpini de șoareci este transgenică și poartă o mutație specifică , distinctă , în *gena CFTR.* Aceste mutații sunt aceleași cu cele observate în variantele de fibroză chistică umană . Acești șoareci transgenici cu fibroză chistică sunt utilizați pentru a studia gama de - fenotipuri distincte care caracterizează fibroza chistică la om . De asemenea , sunt utilizați ca modele pentru a testa potențiale - medicamente împotriva fibrozei chistice . Din păcate , majoritatea tulpinilor de șoareci cu fibroză chistică nu prezintă unul dintre cele mai caracteristice simptome ale acestei boli la om: congestia pulmonară . Vă puteți gândi la vreun motiv pentru care tulpinile de șoareci cu fibroză - chistică nu prezintă acest simptom al fibrozei chistice umane ?

Câmp de dovleci, în care dimensiunea este sub influența alelelor aditive.

23

Genetică cantitativă și trăsături multifactoriale

CONCEPTE CAPITOL

►► Moștenirea cantitativă are ca rezultat o serie de fenotipuri măsurabile pentru o trăsătură poligenică.

►► Cu unele excepții, trăsăturile poligenice tind să prezinte o variație continuă.

►► Trăsăturile cantitative pot fi explicate în termeni mendelieni, anumite alele având un efect aditiv asupra trăsăturilor studiate.

Studiul trăsăturilor poligenice se bazează pe analiza statistică .

►► Valorile de ereditabilitate estimează contribuția genetică la variabilitatea fenotipică în anumite condiții de mediu.

►► Studiile pe gemeni permit o estimare a ereditabilității la specia umană.

►► Locii caracterelor cantitative (QTL) pot fi mapați și identificați.

Până în acest punct al textului, majoritatea exemplelor de variație fenotipică pe care le-am luat în considerare ar putea fi clasificate în mai multe categorii distincte; de exemplu, grupele sanguine ale speciei umane erau A, B, AB sau O; forma dovleacului era sferică, discică sau alungită; iar culoarea ochilor musculiței de fructe era roșie sau albă *(vezi* Capitolul 4). În cazul acestor trăsături, de obicei, un genotip - produce un singur fenotip identificabil, deși fenomene precum expresivitatea și penetranța variabile, pleiotropia și epistaza pot ascunde relația dintre fenotip și genotip.

În acest capitol, vom examina trăsături care nu sunt atât de clar definite, inclusiv multe care au importanță medicală sau agricolă. Trăsăturile pe care ne vom concentra prezintă o variație mult mai mare, cu o gamă continuă de fenotipuri care nu pot fi ușor clasificate. Majoritatea acestor trăsături prezintă *o variație continuă,* inclusiv, de exemplu, înălțimea la oameni, producția de lapte sau carne la bovine, randamentele culturilor sau conținutul de proteine al semințelor. Această variație continuă într-o gamă de fenotipuri este măsurată și descrisă cantitativ, iar acest fenomen - genetic este, prin urmare, cunoscut sub numele de moștenire cantitativă. Deoarece variația fenotipică rezultă din interacțiunea genelor la loci multipli, trăsăturile cantitative sunt adesea numite poligenice (literalmente, „multe gene ”) .

Pentru a complica și mai mult relația dintre genotip și fenotip, genotipul generat la fertilizare stabilește un interval cantitativ în care se poate încadra un anumit individ . Cu toate acestea, fenotipul final este adesea influențat de factorii de mediu la care este expus acest individ. De exemplu, înălțimea umană este influențată genetic, dar este afectată și de factorii de mediu, cum ar fi nutriția . Trăsăturile cantitative (poligenice) ale căror fenotipuri rezultă atât din acțiunea genelor, cât și din influențele mediului sunt adesea numite trăsături multifactoriale sau trăsături complexe. Acești termeni sunt adesea utilizați interschimbabil. Pentru consecvență, pe parcursul acestui capitol, vom folosi termenul *multifactorial* în explicațiile noastre.

În acest capitol, vom examina exemple de moștenire cantitativă, trăsături multifactoriale și unele dintre tehnicile statistice utilizate pentru studierea acestora. De asemenea, vom analiza modul în care geneticienii evaluează importanța relativă a factorilor genetici față de cei de mediu care contribuie la variația fenotipică continuă și vom prezenta metode pentru identificarea și cartografierea genelor care influențează trăsăturile cantitative .

23.1

Nu toate trăsăturile poligenice prezintă variație continuă

Pe lângă trăsăturile cantitative care prezintă variație continuă, există alte două tipuri de trăsături poligenice . Trăsăturile meristice sunt cele în care fenotipurile sunt descrise prin numere întregi. Exemple de trăsături meristice includ numărul de semințe dintr-o păstaie sau numărul de ouă depuse de o găină într- un an. Acestea sunt trăsături cantitative , dar nu au o gamă infinită de fenotipuri: de exemplu, o păstaie poate avea 2, 4 sau 6 semințe, dar nu 5,75. Trăsăturile prag sunt poligenice (și frecvent multifactoriale), dar se disting de trăsăturile continue și meristice prin faptul că au un număr mic de clase fenotipice discrete . Trăsăturile prag sunt de interes pentru geneticienii umani, deoarece un număr tot mai mare de boli sunt suspectate că prezintă acest tip de moștenire poligenică . Un exemplu este diabetul de tip II, cunoscut și sub numele de diabet cu debut tardiv, deoarece afectează de obicei persoanele de vârstă mijlocie sau mai în vârstă . O populație poate fi împărțită în două clase fenotipice pentru această trăsătură - indivizi care au diabet de tip II și indivizi care nu au - așa că, la prima vedere, poate părea mai apropiată de o simplă trăsătură monogenică. Cu toate acestea, nu a fost identificată o singură genă pentru apariția diabetului la adulți . Mai degrabă, combinația de alele prezente în mai multe loci conferă unui individ o probabilitate mai mare sau mai mică de a dezvolta boala . Aceste niveluri variate de risc formează un continuum: la un capăt se află cei cu un risc foarte scăzut de a dezvolta diabet de tip II , în timp ce la celălalt capăt al distribuției se află cei ale căror genotipuri îi fac foarte susceptibili la dezvoltarea bolii (Figura 23.1) . Așa cum

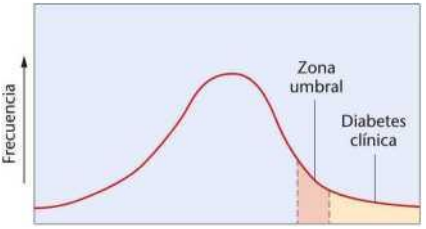
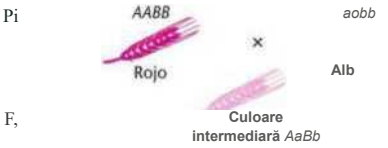


FIGURA 23.1 Descrierea grafică a alelelor care conferă predispoziție, caracteristici ale unei trăsături prag în cadrul unei populații, ilustrată de diabetul de tip II.

În cazul multor trăsături prag, factorii de mediu joacă, de asemenea, un rol în determinarea fenotipului final, dieta și stilul de viață având un impact semnificativ asupra faptului dacă indivizii cu probabilitate genetică moderată sau mare ajung să dezvolte diabet de tip II.



23.2

Caracteristicile cantitative pot fi explicate în termeni mendelieni

Întrebarea dacă variația fenotipică continuă poate fi explicată în termeni mendelieni a dat naștere unor controverse considerabile la începutul secolului al XX-lea. Unii oameni de știință au susținut că, deși factorii sau genele lui Mendel explicau modelele de segregare discontinuă cu clase fenotipice discrete, aceștia nu puteau explica gama de fenotipuri observate în modelele de moștenire cantitativă. Cu toate acestea, geneticienii precum William Bateson și G. Udny Yule, susținători ai unei explicații mendeliene, au propus ipoteza factorilor multipli sau a genelor multiple, conform căreia multe gene, fiecare comportându-se într -o manieră mendeliană, ar contribui la fenotip într-un mod *cumulativ* sau cantitativ .

Ipoteza genelor multiple pentru moștenirea cantitativă

Ipoteza genelor multiple s-a bazat inițial pe un set cheie de rezultate experimentale publicate de Hermann Nilsson-Ehle în 1909. Nilsson-Ehle a folosit culoarea bobului de grâu pentru a testa conceptul conform căruia efectul cumulativ al alelelor la loci multipli dă naștere gamei de fenotipuri observate în trăsăturile cantitative. Într-o serie de experimente, el a încrucișat grâu cu bob roșu cu grâu cu bob alb (Figura 23.2). Generația p1 a prezentat o culoare roz intermediară, ceea ce, la prima vedere, sugera o dominanță incompletă între cele două alele la un locus. Cu toate acestea, în generația F_2 , Nilsson-Ehle nu a observat segregarea tipică a unei încrucișări monohibride. În schimb, aproximativ 15/16 dintre plante au prezentat un anumit grad de culoare roșie a bobului, în timp ce 1/16 dintre plante au avut bob albe. O examinare atentă a generației Fj a relevat că culoarea bobului putea fi clasificată în patru nuanțe diferite de roșu. Întrucât raportul în F2 a apărut în șaisprezecesprezece, se părea că două gene, fiecare cu două alele, controlau fenotipul și se segregau independent una de cealaltă într-o manieră mendeliană.

potențial alel aditiv care contribuie aproximativ în mod egal la culoarea roșie

1/4 AA

F2 1/2 Aa

1/4 88 — 1/16 AABB

1/2 Sib — 2/6 AABb

1/4 66 — 1/16 AAbb

1/4 BB — 2/16 AoBB

1/2 86 — 4/I6A086

1/4 66 — 2/16 Aobb

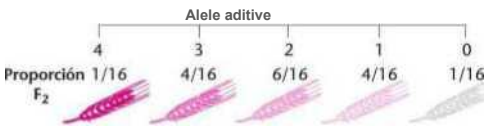
1/4 88 — 1/16 0088

1/4 00

1/2 86 —2/16 00B61

L 1/466—1/16 0066O

2



Roșu ---------- ► Culori intermediare ---------- ► Alb

FIGURA 23.2 Cum explică ipoteza factorilor multipli raportul fenotipic 1:4:6:4:1 al culorii granulelor atunci când toate alelele desemnate cu

majusculă sunt aditive și contribuie cu cantități egale de pigment la fenotip.

Din boabe și o potențială alelă neaditivă care nu produce pigment roșu, putem înțelege cum ipoteza factorilor multipli ar putea explica diferitele fenotipuri de culoare a boabelor. În Pt Ambii părinți ar fi homozigoți; părintele roșu ar avea doar alele aditive *(AABB* în Figura 23.2), în timp ce părintele alb ar avea doar alele neaditive (*aabb).* Plantele Fj sunt

Plantele heterozigote (AaBb) conțin două alele aditive (A și B) și două alele neaditive (e și b) și exprimă fenotipul roz intermediar . Fiecare plantă F _a are 4, 3, 2, 1 sau 0 alele aditive . Plantele F₂ Plantele fără alele aditive sunt albe, ca unul dintre părinții P p, în timp ce plantele Pi cu 4 alele aditive sunt roșii (AABB) ca celălalt părinte P r. Plantele cu 3, 2 și 1 alele aditive constituie celelalte trei categorii de culoare roșie observate în generația F1. Cu cât numărul de alele aditive din genotip este mai mare, cu atât roșul va fi exprimat mai intens în fenotip, deoarece fiecare alelă aditivă prezentă contribuie în mod egal la cantitatea cumulativă de pigment produs în bob.

variația continuă poate fi explicată într-o manieră mendeliană, cu alele aditive la loci multipli care influențează cantitativ fenotipul , dar segregând fiecare alelă conform legilor mendeliene. După cum am văzut în încrucișarea inițială Nilsson-Ehle , dacă ar fi implicați doi loci, fiecare cu două alele, atunci ne-am aștepta la cinci clase fenotipice în F2 într -un raport de 1:4:1 . Cu toate acestea, nu există niciun motiv pentru care trei , patru sau mai multe loci nu pot funcționa similar în controlul mai multor fenotipuri cantitative . Cu cât sunt implicate mai multe loci cantitative, cu atât este mai mare numărul de clase care ar apărea în generația F2 în raporturi mai complexe. Figura 233 ilustrează numărul de fenotipuri și raporturile așteptate în R pentru încrucișări care implică până la cinci perechi de gene.

Aldos aditivi: baza variației continue

Ipoteza genelor multiple constă în următoarele puncte principale.

fenotipice care prezintă variație continuă pot fi cuantificate prin măsurare, cântărire, numărare etc.

2. Adesea , două sau mai multe loci genice, distribuite în întregul genom, explică influența ereditară asupra fenotipului într-un *mod aditiv.* Deoarece pot fi implicate multe gene , acest tip de moștenire se numește *poligenică* .
3. Fiecare locus genic poate fi ocupat fie de o alelă aditivă, care contribuie într-o cantitate constantă la fenotip , fie de o alelă neaditivă, care nu contribuie cantitativ la fenotip.
4. Contribuția fiecărei alele aditive la fenotip, deși adesea mică, este aproximativ egală. Deși acum știm că acest lucru nu este întotdeauna adevărat, am făcut această presupunere în explicația de mai sus.
5. Împreună, alelele aditive care contribuie la aceeași trăsătură cantitativă duc la o variație fenotipică substanțială.

Calculul numărului de poligene

Pentru a estima numărul de poligene, gene care contribuie la o trăsătură cantitativă, au fost dezvoltate mai multe metode

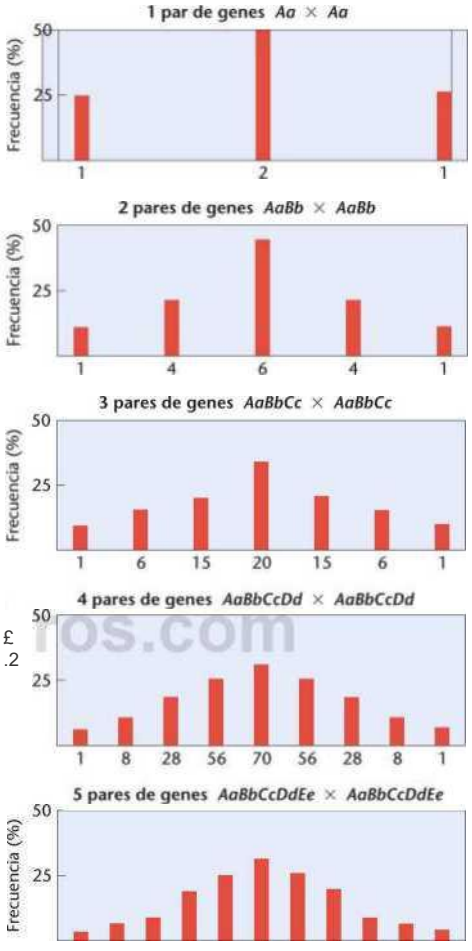


FIGURA 23.3 Proporciones genéticas (en el eje X) resultantes del cruce de dos organismos heterocigóticos cuando actúa la herencia poligénica con 1 a 5 pares de genes. Cada barra de los histogramas indica una clase Fenotípica F_2 diferente, de un extremo (izquierdo) al otro (derecho). Cada fenotipo es el resultado de un número diferente de alelos aditivos.

se poate determina proporția de indivizi din F_2 care seamănă cu *oricare* dintre cele două fenotipuri extreme Pj , numărul de poligene implicate (n) poate fi calculat după cum urmează:

1/4" = proporția de indivizi F2 $_{care}$ exprimă oricare dintre fenotipurile extreme

În exemplul de culoare a boabelor de grâu roșu și alb, rezumat în Figura 23.2, 1/16 dintre urmași sunt roșii sau albi, ca fenotipuri P,. Această proporție poate fi substituită în partea dreaptă a ecuației pentru a calcula *n:*

$$\frac{\frac{1}{4}}{\frac{1}{4^2}} = \frac{\frac{1}{16}}{\frac{1}{16}}$$

$$n = 2$$

Tabelul 23.1 prezintă proporțiile și numărul claselor fenotipice F_2 produse în încrucișări care implică până la patru perechi de gene.

TABELUL 23.1 Determinarea numărului de poligene (n) implicate într-un caracter cantitativ

n.	Indivizii care exprimă orice fenotip extrem	Clase fenotipice distincte
1		3
2	1/16	5
3	1/64	7
4	1/256	9

Pentru un număr mic de poligene (n), uneori este mai ușor să se utilizeze ecuația

(2n + 1) = numărul de categorii fenotipice distincte observate

De exemplu, când sunt implicate două poligene *(n* = 2), (2n + 1) = 5, iar fiecare fenotip rezultă din 4, 3, 2, 1 sau 0 alele aditive. Dacă n = 3, (2n + 1) = 7, iar fiecare fenotip rezultă din 6, 5, 4, 3, 2, 1 sau 0 alele aditive. Prin urmare, aplicând această formulă invers și cunoscând numărul de fenotipuri, putem calcula numărul de poligene care le controlează.

Totuși, trebuie menționat că aceste metode simple de estimare a numărului de poligene implicate într-o trăsătură cantitativă presupun că toate alelele relevante contribuie în mod egal și aditiv și, de asemenea, că expresia fenotipică în generația F1 nu este afectată semnificativ de factorii de mediu. După cum vom vedea mai târziu, aceste presupuneri s-ar putea să nu fie valabile pentru multe trăsături cantitative.

ACUM REZOLVĂ ASTA

23.1 O plantă homozigotă cu flori de 20 cm în diametru este încrucișată cu o altă plantă homozigotă din aceeași specie care are flori de 40 cm în diametru. Toate plantele F2 au flori de 30 cm în diametru. În generația F2 de 512 $_{plante}$, 2 plante au flori de 20 cm în diametru, alte 2 au flori de 40 cm în diametru , *iar* restul de 508 plante au flori cu o dimensiune cuprinsă între aceste două extreme.

(a) Presupunând că toate alelele implicate acționează aditiv, câte gene controlează dimensiunea florii la această plantă?

(b) Ce distribuție de frecvență a diametrului florii ar fi de așteptat la urmașii unei retroîncrucișări între o plantă F și părintele cu flori mai mari?

■ **SUGESTIE:** *Această problemă oferă date despre generațiile F1 și F2 pentru o încrucișare care implică o trăsătură cantitativă și vă cere să calculați numărul de gene care controlează trăsătura. Cheia rezolvării acestei probleme este să rețineți că, dacă nu se cunoaște numărul total de fenotipuri F2 distincte implicate , trebuie să utilizați proporția (nu numărul) de fenotipuri parentale care reapar în generația F2 pentru a determina numărul de gene implicate.*

23.3 Studiul trăsăturilor poligenice depinde de analiza statistică

■

Înainte de a analiza metodele utilizate de geneticieni pentru a determina cât din variația fenotipică observată într-o populație se datorează diferențelor genetice dintre indivizi și cât factorilor de mediu, trebuie să luăm în considerare instrumentele statistice de bază pe care le utilizează pentru a îndeplini această sarcină. De obicei, nu este fezabil să se măsoare expresia unei trăsături poligenice la fiecare individ dintr -o populație, așa că , de obicei , pentru a efectua măsurarea, un grup de indivizi este selectat aleatoriu pentru a oferi un *eșantion.* Este important să ne amintim că acuratețea rezultatelor finale ale măsurătorilor depinde de faptul dacă eșantionul este cu adevărat aleatoriu și reprezentativ pentru populația studiată . De exemplu, să presupunem că un elev dorește să determine înălțimea medie a 100 de elevi din clasa sa de genetică și, pentru eșantionul său , îi măsoară pe cei doi elevi care stau lângă el, care sunt discipoli din echipa de baschet a școlii . Este puțin probabil ca acest eșantion să ofere o estimare bună a înălțimii medii a clasei din două motive : în primul rând, este prea mic ; în al doilea rând, nu este un subgrup reprezentativ

al clasei (cu excepția cazului în care toți cei 100 de elevi joacă ca discipol în echipa de baschet).

Dacă eșantionul analizat pentru exprimarea unei trăsături cantitative este suficient de mare și reprezentativ pentru populația din care a fost prelevat, constatăm adesea că datele formează o distribuție normală; adică , generează o curbă caracteristică în formă de clopot atunci când sunt reprezentate printr-o histogramă de frecvență (Figura 23.4). În analiza trăsăturilor care prezintă o distribuție normală , sunt utile mai multe concepte statistice , inclusiv media, varianța, deviația standard , eroarea standard a mediei și covarianța.

Media

Media oferă informații despre locul în care se află punctul central în intervalul de măsurători pentru o trăsătură cantitativă. Figura 23.5 prezintă curbele de distribuție pentru două seturi diferite de măsurători fenotipice. Fiecare dintre aceste seturi de măsurători se grupează în jurul unei valori centrale (după cum puteți vedea, ambele se grupează în jurul aceleiași valori). Această grupare se numește tendință centrală, iar punctul central este media .

Mai exact, media (X) este media aritmetică a unui set de măsurători și se calculează ca

$$X = \frac{\wedge}{n}$$

unde *X* este media , XX reprezintă suma tuturor valorilor individuale din eșantion și *n* este numărul de valori individuale.

Media oferă un rezumat descriptiv util al eșantionului, deși nu ne spune nimic despre intervalul sau extinderea datelor. Așa cum este ilustrat în Figura 23.5, o distribuție simetrică a valorilor dintr-un eșantion se poate grupa, într-un caz, în apropierea mediei. Sau , un alt set de măsurători poate avea aceeași medie, dar valorile pot fi dispersate.

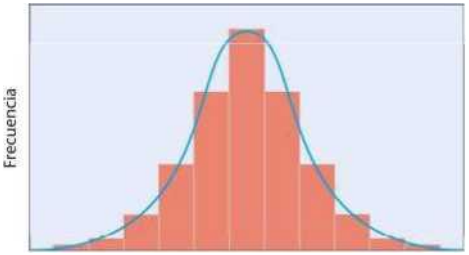


FIGURA 23.4 Distribuția normală a frecvențelor, caracterizată printr-o curbă în formă de clopot.

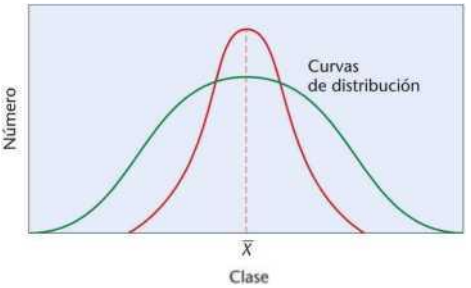


FIGURA 23.5 Două distribuții normale de frecvență cu aceeași medie, dar cu valori diferite ale variației.

distribuite mai larg în jurul acesteia. O a doua statistică, varianța, oferă informații despre dispersia datelor în jurul mediei.

Varianță

Varianța (s^2) a unui eșantion este distanța medie la pătrat a tuturor măsurătorilor față de medie . Se calculează folosind formula:

$$, S(X_i - X)^2$$

unde suma (S) pătratelor diferențelor dintre fiecare valoare (X,) și medie (X) se împarte la mărimea totală a eșantionului minus unu (n = 1).

După cum se arată în Figura 23.5, este posibil ca două seturi de măsurători ale eșantionului pentru o trăsătură cantitativă să aibă aceeași medie, dar o distribuție diferită a valorilor în jurul acesteia, ceea ce se reflectă în variante diferite. Estimarea variației poate fi utilă în determinarea gradului de control genetic al trăsăturilor atunci când mediul înconjurător influențează, de asemenea, fenotipul .

Abaterea standard

Deoarece varianța este o valoare ridicată la pătrat, unitățile sale de măsură sunt, de asemenea, ridicate la pătrat ($m^2 \cdot g^2$ etc.). Pentru a exprima variația în jurul mediei în unitățile de măsură originale, putem folosi rădăcina pătrată a variației, un termen numit abatere standard (s):

$$s = \sqrt{s^2}$$

Tabelul 23.2 prezintă procentul de valori individuale dintr-o distribuție normală care se încadrează în intervalul diferiților multipli ai abaterii standard. O abatere standard de o parte și de alta a mediei cuprinde 68% din toate

valorile eșantionului. Aproximativ 95% din toate valorile se află în intervalul a două abateri standard de o parte și de alta a mediei. Aceasta înseamnă că abaterea standard poate fi interpretată și ca o probabilitate. De exemplu, o măsurătoare a unui eșantion luată aleatoriu are o probabilitate de 68% de a se încadra în intervalul unei abateri standard de o parte și de alta a mediei.

Tabelul 23.2 Mostre incluse pentru diferite valori ale lui s

Multipli de s	Probe incluse (%)
X ± 1s	68,3
X ± 1,96$	95,0
X* ±2*s	95,5
X ± 3$	99,7

Eroare medie tipică

Dacă se prelevează mai multe eșantioane dintr-o populație și se măsoară pentru aceeași caracteristică cantitativă, este posibil să constatăm că mediile acestora variază. Teoretic, eșantioanele mari, luate cu adevărat la întâmplare, vor reprezenta populația mai precis, iar mediile lor vor fi mai apropiate una de cealaltă. Pentru a măsura acuratețea mediei eșantionului, folosim eroarea standard a mediei (S*), care se calculează după cum urmează: unde s este deviația standard, iar V <*sub*>*i*</*sub*> este rădăcina pătrată a dimensiunii eșantionului. Deoarece eroarea standard a mediei se calculează prin împărțirea *lui s* la V_i, aceasta este întotdeauna o valoare mai mică decât deviația standard.

Covarianță

Adesea, geneticienii care lucrează cu trăsături cantitative trebuie să ia în considerare simultan două trăsături fenotipice . De exemplu, un crescător de pui ar putea calcula corelația dintre greutatea corporală și producția de ouă la găini: vor avea păsările mai grele tendința de a depune mai multe ouă? Covarianța măsoară gradul de variație comun ambelor trăsături cantitative. Se calculează prin luarea abaterilor fiecărei trăsături de la medie (așa cum s-a procedat pentru estimarea varianței) pentru fiecare individ din eșantion . Aceasta oferă o pereche de valori pentru fiecare individ, care se înmulțesc, iar suma tuturor acestor produse individuale se împarte la numărul de indivizi din eșantion minus unu. Astfel, covarianța este dată de cov(x). Din două grupuri de măsurători, *X* și X, ale unui caracter, se calculează

COVxr = SKX. -XXX- X)]

Covarianța poate fi normalizată cu o altă statistică, coeficientul de corelație (r), care se calculează după cum urmează

r ~ COVyy/SySy

unde S _x este deviația standard a primului grup de măsurători cantitative X ₁ și S_y este deviația standard a celui de-al doilea grup de măsurători X ₂. Valorile coeficientului de corelație r variază de la -1 la +1. Valorile pozitive ale lui *r* indică faptul că o creștere a măsurătorii unei trăsături tinde să fie asociată cu o creștere a măsurătorii celeilalte trăsături, în timp ce valorile negative ale lui *r* indică faptul că o creștere a unei trăsături este asociată cu o scădere a celeilalte. Astfel, dacă găinile mai grele tind să depună mai multe ouă, ar trebui să ne așteptăm la o valoare *r pozitivă* . În schimb, o valoare r negativă sugerează că cea mai mare producție de ouă va fi probabil asigurată de găinile mai ușoare . Un punct important de reținut despre coeficienții de corelație este că, chiar și valori semnificative ale lui r - apropiate de +1 și -1 - nu implică o relație cauză-efect între cele două trăsături. Analiza corelației ne spune pur și simplu gradul în care variația unei caracteristici cantitative este asociată cu variația alteia , nu ce anume cauzează acea variație.

Analiză de natură cantitativă

Pentru a aplica aceste concepte statistice, să luăm în considerare un experiment genetic în care sunt încrucișate două soiuri de roșii homozigote. Unul dintre soiurile de roșii produce fructe cu o greutate medie de 360 de grame, în timp ce fructul celuilalt soi are o greutate medie de 120 de grame. Generația F1 , obținută prin încrucișarea acestor două soiuri, constă din fructe cu greutăți cuprinse între 200 și 280 de grame . Populația F2 include indivizi care produc fructe în intervalul 120 - 360 de grame. Tabelul 23.3 prezintă rezultatele care caracterizează ambele generații.

H Distribución de las progenies F_y y F_2 obtenida a partir de un cruce teórico entre dos variedades de tomate

		Peso (gramos)												
		120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360
Número de individuos	Fi					4	14	16	12	6				
	F,	1	1	2	0	9	13	17	14	7	4	3	0	1

Greutatea medie a fructelor în generația F_1 se calculează ca fiind

$$\frac{IX_i}{n} \quad \frac{12.520}{52} = 240,8$$

Valoarea medie a greutății fructelor în $F2_{se}$ calculează ca

$$\frac{\text{ÏX,}}{ri} \quad \frac{17.440}{72} = 242,2$$

Deși aceste valori medii sunt similare, distribuția frecvenței din Tabelul 23.3 prezintă o variație mai mare în generația F. Intervalul de variație poate fi cuantificat ca varianța eșantionului s^2, calculată, așa cum am văzut anterior, ca suma diferențelor la pătrat dintre fiecare valoare și medie, împărțită la numărul total de observații minus 1.

$$S = \frac{S(X, -X)^2}{n - 1}$$

Odată efectuat calculul de mai sus, se obține că varianța este egală cu 517,04 pentru generația F și 1707,67 pentru generația F2 . Când sunt convertite în abateri

ACUM REZOLVĂ ASTA

Tabelul următor prezintă măsurătorile lungimii fibrei și greutății lânii pentru o turmă *mică* de opt oi .

	Lungimea fibrei (cm)	Greutatea lânii (kg)
1	9,7	7.9
2	5.6	4.5
3	10.7	8.3
4	6.8	5.4
5	11.0	9.1
6	4.5	4.9
7	7.4	6.0
8	5.9	5.1

(a) Care este media, varianța și Care este abaterea standard pentru fiecare dintre aceste caracteristici?

(b) Care este covarianța celor două caractere ?

(c) Care este coeficientul de corelație dintre lungimea fibrei și greutatea lânii ?

(d) Crezi că greutatea mai mare a lânii este cauzată de o creștere a lungimii fibrelor? De ce da sau de ce nu?

■ SUGESTIE: *Această problemă oferă date pentru două trăsături cantitative și ne cere să efectuăm mai multe calcule statistice , cu scopul final de a determina dacă trăsăturile sunt corelate. Cheia rezolvării constă în faptul că, odată ce calculele pentru obținerea coeficientului de corelație (r) sunt finalizate, trebuie să interpretăm semnificația acestei valori - dacă este pozitivă sau negativă și cât de aproape este de zero.* Pentru valorile tipice (s = V?), valorile sunt 22,74 și, respectiv, 41,32 . Prin urmare , distribuția greutății tomatelor în generația Fj poate fi exprimată ca 240,8 ± 22,74 , iar în generația F2 ca 242,2 ± 4 1,32 .

Presupunând că ambele soiuri de roșii sunt homozigote pentru loci - urile de interes și că alelele care controlează greutatea fructelor acționează aditiv , putem estima numărul de poligene implicate în această trăsătură. Deoarece 1/72 dintre urmașii F2 Au un fenotip care se suprapune cu una dintre varietățile parentale (dintre cei 72 de urmași din F2, unul cântărește 120 de grame și altul 360 de grame ; vezi Tabelul 24.3), utilizarea formulei 1/4" = 1/72 ne spune că *n* Se găsește între 3 și 4, ceea ce oferă dovezi despre numărul de gene care controlează greutatea fructelor la aceste soiuri de roșii.

23.4

Valorile de ereditabilitate estimează contribuția genetică la variabilitatea fenotipică

■

Întrebarea cea mai frecventă pusă de geneticienii care lucrează cu tulburări și trăsături multifactoriale este cât de mult din *variația* fenotipică observată într- o populație se datorează diferențelor genetice dintre indivizi și cât de mult se datorează mediului. Termenul de ereditabilitate este folosit pentru a descrie *proporția din variația fenotipică totală dintr* - o *populație care se datorează factorilor genetici.* Pentru o trăsătură multifactorială într - o anumită populație, o estimare a ereditabilității ridicate indică faptul că o mare parte din variație poate fi atribuită factorilor genetici, mediul având un impact mai mic asupra expresiei trăsăturii . Cu o estimare a ereditabilității scăzută , factorii de mediu sunt susceptibili să aibă un impact mai mare asupra variației fenotipice în cadrul populației .

Conceptul de ereditabilitate este frecvent înțeles greșit și utilizat greșit. Trebuie subliniat faptul că ereditabilitatea nu indică cât de mult dintr -o trăsătură este determinată genetic și nici proporția în care fenotipul unui individ se datorează genotipului său. În ultimii ani, o astfel de interpretare greșită a ereditabilității pentru trăsăturile umane cantitative a dus la controverse, în special în ceea ce privește măsurarea coeficienților de inteligență sau IQ-ului. Variația estimărilor ereditabilității pentru IQ între diferitele grupuri rasiale studiate a condus la sugestii incorecte conform cărora factorii - genetici inalterabilici controlează diferențele de niveluri de inteligență între persoanele de origini diferite . Astfel de sugestii denaturează sensul ereditabilității și ignoră contribuția interacțiunii genotip-mediu la variația fenotipică în cadrul unei populații . În plus, ereditabilitatea unei trăsături

nu este fixă. De exemplu, o estimare a ereditabilității producției de ouă într -o turmă de găini crescute în cuști ar putea fi mare, indicând faptul că diferențele în producția de ouă între păsări se datorează în mare măsură diferențelor genetice, deoarece toate se află într-un mediu foarte similar. Pentru un alt efectiv de găini ținut în aer liber, ereditabilitatea producției de ouă ar putea fi mult mai mică, deoarece variația între găinile individuale poate reflecta și diferențe în mediile lor individuale. Astfel de diferențe ar putea include câtă hrană caută fiecare găină și dacă aceasta concurează cu succes pentru un loc bun de odihnă noaptea. Astfel, o estimare a ereditabilității ne spune proporția variației fenotipice care poate fi atribuită variației genetice *în cadrul unei anumite populații într-un anumit mediu.* Dacă măsurăm ereditabilitatea aceleiași trăsături în diferite populații dintr-o gamă largă de medii, vom constata de obicei că valorile calculate ale ereditabilității au erori standard mari. Acesta este un punct important de reținut atunci când se iau în considerare estimările ereditabilității pentru trăsăturile din populațiile umane. O estimare medie a ereditabilității de 0,65 pentru înălțimea umană nu înseamnă că înălțimea noastră se datorează în proporție de 65% genelor noastre, ci mai degrabă că, în populațiile eșantionate, în medie, *65% din totalul variației de înălțime poate fi explicat prin diferențe genetice între indivizi.*

Având în vedere această distincție subtilă, dar importantă, vom analiza acum modul în care geneticienii împart variația fenotipică observată într-o populație în componentele sale genetice și de mediu. După cum am văzut în secțiunea anterioară, această variație poate fi cuantificată ca varianță a eșantionului : prin efectuarea de măsurători ale trăsăturii în cauză într -un eșantion reprezentativ al populației și determinarea gradului de dispersie a acestor măsurători în jurul mediei eșantionului. Aceasta ne oferă o estimare a variației fenotipice totale a populației (*VP*). Estimările de ereditabilitate sunt obținute folosind diferite tehnici experimentale și statistice pentru a aloca VP *componentelor* sale: varianța genotipică (VG) și varianța de mediu (*VE*).

Un al treilea factor care contribuie la nivelurile generale de variație fenotipică este gradul în care genotipurile individuale - afectează fenotipul diferit, în funcție de mediu. De exemplu, soiul de grâu A poate produce o medie de 1.350 kg pe hectar în sol sărac, în timp ce soiul B produce o medie de 1.150 kg pe hectar. În sol bun, soiul A produce 1.485 kg pe hectar, în timp ce soiul B produce o medie de 1.685 kg pe hectar. Există diferențe de productivitate între cele două soiuri genotipic distincte, astfel încât variația randamentului la grâu are o componentă genetică. Ambele soiuri produc mai mult în sol bun, deci randamentul este afectat și de mediu. Cu toate acestea, observăm și că cele două soiuri nu răspund în același mod în condiții bune de sol: genotipul soiului de grâu B realizează o creștere mai mare a producției în sol bun decât soiul A. Astfel, avem diferențe în interacțiunea genotipului cu mediul care contribuie la variația productivității în populațiile de grâu . Această a treia componentă a variației fenotipice este varianța interacțiunii genotip-mediu (V_G x μ_A) . ȘI) (Figura 23.6).

Putem acum rezuma toate componentele variației fenotipice totale *Vp,* folosind următoarea ecuație:

$$Vp = V_G + V_E + V_{GX£}$$

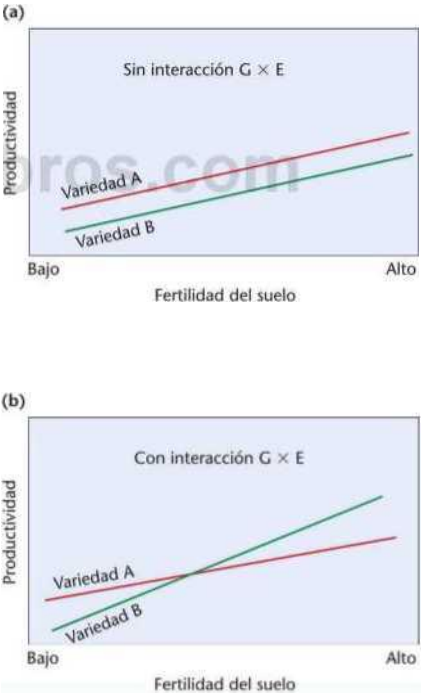


FIGURA 23.6 Diferențe de productivitate între două soiuri de grâu în soluri cu niveluri diferite de fertilitate , (a) Fără interacțiune genotip-mediu, G XE: soiurile prezintă diferențe genetice în productivitate, dar răspund în același mod atunci când fertilitatea solului crește , (b) Cu interacțiune GXE : soiul A depășește soiul B în producție în soluri sărace , dar soiul B produce mai mult decât A atunci când nivelurile de fertilitate cresc .

Cu alte cuvinte, varianța fenotipică totală poate fi subdivizată în varianță genotipică, varianță de mediu și varianță de interacțiune genotip-mediu. Atunci când obțin estimări de ereditabilitate pentru o trăsătură multifactorială, cercetătorii presupun adesea că varianța de interacțiune genotip-mediu este suficient de mică pentru a fi ignorată sau combinată cu varianța de mediu. Cu toate acestea , merită să ne amintim că acest tip de aproximare este un alt motiv pentru care valorile de ereditabilitate sunt *estimări* pentru o anumită populație, nu un *atribut fix* al trăsăturii.

Crescătorii de soiuri de animale și plante utilizează o gamă largă de tehnici experimentale pentru a estima ereditabilitatea prin împărțirea măsurătorilor variației fenotipice în componentele lor genetice și de mediu. O metodă implică utilizarea tulpinilor consangvinizate care conțin indivizi omogeni genetic cu genotipuri foarte homozigote. Apoi, aceștia proiectează experimente pentru a testa efectele diferitelor condiții de mediu asupra variabilității fenotipice. Variația *dintre diferitele tulpini consangvinizate cultivate într-* un mediu constant se datorează predominant factorilor genetici. Variația *dintre* membrii aceleiași tulpini consangvinizate cultivate în condiții diferite este mai probabil să se datoreze factorilor de mediu. Alte metode implică analizarea variației unei trăsături cantitative între urmașii din diferite *încrucișări* sau compararea expresiei unei trăsături între urmași și părinții crescuți sau crescuți în același mediu.

Ereditabilitate în sens larg

Eritabilitatea în sens larg (reprezentată de termenul H2) măsoară contribuția variației genotipice la varianța fenotipică totală . Se estimează ca proporția :

$$\frac{V_G}{}$$

Valorile de ereditabilitate pentru o trăsătură într-o populație variază de la 0,0 la 1,0. O valoare apropiată de 1,0 indică faptul că condițiile de mediu au un impact redus asupra variației fenotipice, care, prin urmare, se datorează în mare măsură diferențelor genetice dintre indivizii din populație. Valorile apropiate de 0,0 indică faptul că factorii de mediu, nu diferențele genetice, sunt în mare măsură responsabili pentru variația fenotipică observată în populația studiată. Foarte puține trăsături cantitative au estimări de ereditabilitate foarte mari sau foarte mici, ceea ce sugerează că atât genele, cât și mediul joacă un rol în exprimarea multor fenotipuri ale trăsăturii.

Componenta variației *genotipice Vc* Estimarea ereditabilității în sens larg utilizată în estimările ereditabilității include toate tipurile de variație genetică din populație. Nu face distincție între loci-urile trăsăturilor cantitative cu alele care acțiune aditiv și cele cu efecte epistatice sau dominante . Heritabilitatea în sens larg presupune, de asemenea, că componenta de varianță genotip-mediu este neglijabilă. Deși estimările ereditabilității în sens larg pentru o trăsătură sunt de interes genetic general , aceste limitări fac ca acest tip de ereditabilitate să nu fie foarte util în programele de ameliorare . Amelioratorii de soiuri de animale și plante care doresc să dezvolte soiuri îmbunătățite, cu randament ridicat, au nevoie de estimări mai precise ale ereditabilității trăsăturilor pe care doresc să le manipuleze în populație. Prin urmare, a fost conceput un alt tip de estimare, ereditabilitatea în sens restrâns , care este mai practică.

Ereditatea în sens strict

Eritabilitatea strictă (/»“) este proporția variației fenotipice datorată exclusiv variației genotipice aditive. Varianța genotipică poate fi împărțită în două subcomponente care reprezintă diferitele moduri de acțiune ale alelelor la locurile unei trăsături cantitative . Deoarece nu toate genele implicate într -o trăsătură cantitativă afectează fenotipul în același mod, această partiție distinge între trei tipuri diferite *de* acțiune a genelor care contribuie la varianța genotipică. Varianța aditivă, *VA* . Varianța genotipică este varianța genotipică datorată acțiunii aditive a alelelor la loci-urile unei trăsături cantitative. Varianța dominanței, V <*sub*> *D</sub>* , este abaterea de la componentele aditive care rezultă atunci când expresia fenotipică la indivizii heterozigoți nu este exact intermediară între cele două organisme homozigote. Varianța interacțiunii, V_i, este abaterea de la componentele aditive care apare atunci când două sau mai multe loci se comportă epistatic. Valoarea variației interacțiunii este adesea neglijabilă, așa că această componentă este de obicei exclusă din calculele variației genotipice totale .

Împărțirea variației genotipice totale *v, este* rezumată în ecuație

$$vc = Kt + vD + V ,$$

și o estimare a ereditabilității în sens strict, bazată doar pe porțiunea de varianță genotipică datorată acțiunii genelor aditive este

$$h^2 = \frac{V_A}{V_p}$$

Omițând *V* și separând *Vp în* componentele sale de varianță genotipică și de mediu , *obținem,*

$$V_E + V_A + \text{Vp}$$

Estimările de ereditabilitate sunt utilizate în dezvoltarea - soiurilor de animale și plante pentru a indica răspunsul potențial al unei populații la selecția artificială a unei trăsături cantitative. Heritabilitatea în sens restrâns, *h², oferă º* predicție mai precisă a răspunsului la selecție decât heritabilitatea în sens larg, H² *, și,* prin urmare, amelioratorii și cultivatorii de noi soiuri utilizează *h² mai frecvent ·*

Selecție artificială

Selecția artificială este un proces de selectare a unor indivizi specifici cu fenotipuri preferate dintr-o populație inițial eterogenă, în scopul încrucișării. Teoretic, dacă selecția artificială bazată pe aceleași preferințe pentru trăsături este repetată timp de mai multe generații, se poate dezvolta o populație cu o frecvență mare de indivizi cu caracteristicile dorite . Dacă se selectează o trăsătură simplă controlată de una sau două gene supuse unei influențe reduse a mediului, este relativ ușor și rapid să se genereze populația dorită de animale sau plante. Cu toate acestea, multe trăsături importante din punct de vedere economic la culturi și animale, cum ar fi randamentul cerealelor, creșterea în greutate sau producția de lapte la bovine sau viteza și forța la cai, sunt poligenice și frecvent multifactoriale. Selecția artificială a unor astfel de trăsături este mai lentă și mai complexă. Estimările ereditabilității stricte sunt valoroase pentru amelioratorii de soiuri de animale și plante , - deoarece, așa cum tocmai am văzut, acestea estimează proporția din varianța fenotipică totală a unei trăsături care se datorează variantei genotipice aditive . Alelele trăsăturilor cantitative cu acțiune aditivă sunt cele mai ușor de manipulat pentru un ameliorator. Alelele loci-urilor cantitative ale trăsăturilor care produc efecte de interacțiune dominante sau epistatice (și, prin urmare, contribuie la varianța variantelor dominante sau genotipice) răspund mai puțin la selecția artificială. Astfel, ereditabilitatea strictă, *h_r,* poate fi utilizată pentru a măsura impactul selecției . Cu cât valoarea estimată a lui *h _r* într-o populație este mai mare, cu atât este mai mare schimbarea intervalului fenotipic al trăsăturii pe care amelioratorul o va observa în următoarea generație.

Împărțirea componentelor varianței genetice pentru a calcula *h²* și a prezice răspunsul la selecție este o sarcină complexă care necesită un design și o analiză experimentală atentă. Cea mai simplă abordare *implică* selectarea indivizilor cu cele mai bune fenotipuri pentru trăsătura cantitativă dorită dintr-o populație eterogenă și înmulțirea lor. Scorul mediu al trăsăturii acestor urmași (M²) poate fi apoi comparat *cu* : (1) scorul mediu al populației originale (M) și (2) scorurile indivizilor selectați utilizați ca părinți (MI). Relația dintre aceste trei medii și *h²* este

$$\text{, , M2 - M}$$
$$\text{Du-te -}$$
$$\text{MI -M}$$

Această ecuație poate fi simplificată în continuare prin definirea lui M2 - M ca răspuns de selecție (R) (gradul de răspuns la încrucișarea părinților selectați) și a lui MI - M ca diferențial *de selecție* (S) (diferența dintre media pentru întreaga populație și media pentru populația selectată), astfel încât *h2* reflectă proporția răspunsului observat în raport cu răspunsul total posibil. Astfel,

O valoare a ereditabilității stricte obținută în acest mod prin încrucișări selective și măsurarea răspunsului la urmași este o estimare a ereditabilității realizate .

Ca exemplu de estimare a ereditabilității realizate , să presupunem că măsurăm diametrul boabelor de porumb dintr -o populație în care diametrul mediu M este de 20 mm. Din această populație, selectăm un grup cu cele mai mici diametre , care au un MI mediu de 10 mm. Plantele selectate sunt încrucișate , iar diametrul mediu al boabelor urmașilor M2 este de *13 mm. Putem calcula ereditabilitatea realizată h2 pentru* a estima potențialul selecției artificiale asupra dimensiunii boabelor :

$$\text{M2 -M } h \text{ — -}$$
$$\text{MI -M}$$
$$\text{.i 13-20}$$
$$\text{10 - 20}$$
$$\text{-7}$$
$$\sim \text{-10}$$
$$= 0{,}70$$

Această valoare a ereditabilității stricte indică faptul că potențialul selectiv pentru dimensiunea granulelor este relativ - ridicat.

Cel mai lung experiment de selecție artificială este încă în desfășurare la Laboratorul Agricol al Statului Illinois . Din 1896, porumbul a fost selectat pentru conținutul ridicat și scăzut de ulei. După 76 de generații, selecția continuă să crească conținutul de ulei (Figura 23.7). În fiecare

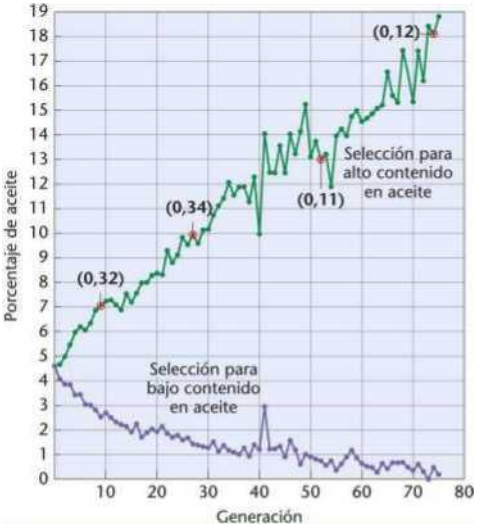


FIGURA 23.7 Răspunsul porumbului la selecția pentru conținut ridicat și scăzut de ulei pe parcursul a 76 de generații. Numărul dintre paranteze din generațiile 9, 27, 52 și 76 de pe linia pentru „conținut ridicat de ulei" indică calculul ereditabilității în acele puncte din experimentul continuu.

Într -un ciclu de selecție reușit, un număr mai mare de plante de porumb acumulează un procent mai mare de alele aditive implicate în producția de ulei . În consecință , ereditabilitatea strictă *h2* Rata de creștere a conținutului de ulei în generațiile succesive a scăzut (vezi valorile din paranteze pentru generațiile 9, 27, 52 și 76 în Figura 23.7) pe măsură ce selecția artificială s-a apropiat din ce în ce mai mult de potențialul genetic optim pentru producția de ulei . Teoretic, acest proces va continua până când toți indivizii din populație vor poseda un genotip uniform care include toate alelele aditive responsabile pentru conținutul mai mare de ulei. În acel moment, *h*~ Acesta va scădea la zero, iar răspunsul la selecția artificială va înceta. Scăderea răspunsului la selecția pentru conținut scăzut de ulei arată că ereditabilitatea trăsăturii se apropie de acel punct.

Tabelul 23.4 oferă o listă de estimări ale ereditabilității , exprimate în procente, pentru o serie de trăsături cantitative la diferite organisme . După cum putem vedea, aceste valori h^2 variază, dar ereditabilitatea tinde să fie scăzută pentru trăsăturile cantitative care sunt esențiale pentru supraviețuirea unui organism. Rețineți că acest lucru nu înseamnă că nu *există nicio contribuție genetică la fenotipurile observate pentru astfel de trăsături, ci mai degrabă că* valorile scăzute *ale* h^2 demonstrează că selecția naturală a optimizat deja în mare măsură componenta genetică a acestor trăsături de-a lungul evoluției. Producția de ouă, dimensiunea carcasei *și* rata de concepție sunt exemple în care astfel de limitări fiziologice ale procesului de selecție au fost deja atinse. Trăsăturile care sunt mai puțin esențiale pentru supraviețuire, cum ar fi greutatea corporală, lungimea cozii și lungimea aripilor, au ereditabilități mai mari, deoarece există încă o mare variație genotipică prezentă în populație pentru aceste trăsături. Rețineți, de asemenea, că orice estimare a ereditabilității poate oferi doar informații despre o populație dintr-un mediu specific. Prin urmare, ereditabilitatea în sens strict este un predictor al răspunsului la selecție, care este cel mai util atunci când estimările sunt calculate pentru multe populații și medii și arată prezența unei tendințe clare.

TABELUL 23.4 Estimări ale ereditabilității trăsăturilor la diferite organisme

Caracter	Eritabilitate (h^2)
Mouse	
Lungimea cozii	60%
Greutatea corporală	37
Dimensiunea cuibului	15
Pui	
Greutatea corporală	50
Producția de ouă	20
Eclozarea ouălor	15
Bovine	
Greutatea la naștere	45 de ani
Producția de lapte	44
Rata de concepție	3

23,5

Studiile pe gemeni ne permit să estimăm ereditabilitatea la specia umană

Gemenii pot fi foarte utili pentru a examina cât de multă variantă într-o trăsătură multifactorială se datorează genotipului și cât de mult mediului înconjurător. În aceste studii, principiul de bază a fost acela că gemenii monozigoți (MZ) sau identici provin dintr-un singur zigot care se divide mitotic și apoi se divide spontan în două celule separate. Aceste celule dau naștere la embrioni identici genetic. În schimb , gemenii dizigoți (DZ) sau fraterni provin din două fertilizări separate

și sunt la fel de similari genetic ca oricare doi frați, împărtășind în medie 50% din alelele lor. Prin urmare, pentru o anumită trăsătură, diferențele fenotipice dintre perechile de gemeni identici sunt echivalente cu varianța de mediu *(VE)* (deoarece varianța genotipică este zero). Cu toate acestea, diferențele fenotipice dintre gemenii DZ prezintă atât varianță de mediu (V _B), cât și aproximativ jumătate din varianța genotipică (V_G). Compararea variației fenotipice pentru aceeași trăsătură în grupuri de gemeni monozigoți și dizigoți oferă o estimare a ereditabilității în sens larg a trăsăturii.

Gemenii sunt considerați concordanți pentru o anumită trăsătură dacă ambii o exprimă sau niciunul nu o exprimă. Dacă unul exprimă trăsătura, iar celălalt nu, perechea de gemeni este considerată discordantă. 1. Compararea valorilor de concordanță ale gemenilor MZ cu cele ale gemenilor DZ crescuți împreună ilustrează valoarea potențială a estimării ereditabilității . Puteți vedea un exemplu în secțiunea următoare, „Acum rezolvați acest lucru".

Înainte de a putea trage concluzii din studiile pe gemeni, datele trebuie examinate cu mare atenție. De exemplu, dacă ratele de concordanță la gemenii MZ se apropie de 90 până la 100%, am putea tinde să interpretăm acest lucru ca indicând o contribuție genetică importantă la fenotipul trăsăturii. În unele cazuri - de exemplu, grupa sanguină și culoarea ochilor - știm că acesta este într-adevăr cazul. Cu toate acestea, în cazul rujeolei, o rată mare de concordanță indică pur și simplu că trăsătura este aproape întotdeauna indusă de un factor de mediu - în acest caz, un virus.

Este mai semnificativ să se compare *diferențele* în ratele de concordanță dintre gemenii monozigoți și dizigoți . Dacă aceste rate sunt semnificativ mai mari pentru gemenii monozigoți decât pentru gemenii dizigoți , suspectăm că o componentă genetică puternică este implicată în determinarea trăsăturii. În cazul rujeolei, unde concordanța este ridicată la ambele tipuri de gemeni, se presupune că mediul este principalul factor care contribuie . O astfel de analiză este utilă deoarece caracteristicile fenotipice care rămân similare în medii diferite sunt susceptibile de a avea o componentă genetică puternică.

Studiile cu gemeni au unele limitări

Deși foarte interesante, studiile pe gemeni umani prezintă unele surse inevitabile de eroare. De exemplu, gemenii MZ sunt adesea tratați mai similar de către părinți și profesori decât gemenii DZ, în special atunci când frații DZ sunt de sexe diferite. Această circumstanță poate crește ponderea relativă a variației de mediu pentru perechile de gemeni non-identici . O altă sursă potențială de eroare o reprezintă interacțiunile dintre genotip și mediu, care duc la variabilitate fenotipică . Aceste interacțiuni pot crește varianța fenotipică totală la gemenii DZ în comparație cu cea a gemenilor MZ crescuți în același mediu, influențând estimările de ereditabilitate. Pe scurt, estimările de ereditabilitate pentru trăsăturile umane bazate pe studii pe gemeni ar trebui considerate aproximări și examinate foarte atent înainte de a trage orice concluzii.

Deși ar trebui adesea considerate cu prudență, studiile clasice pe gemeni, bazate pe presupunerea că gemenii MZ au același genom, au fost valoroase pentru estimarea ereditabilității unei game largi de trăsături, inclusiv tulburări multifactoriale, cum ar fi bolile cardiovasculare , diabetul și bolile mintale. În mod evident, aceste boli au componente genetice , iar studiile pe gemeni oferă baza pentru studierea interacțiunilor dintre gene și factorii de mediu. Cu toate acestea , rezultatele cercetării genomice au contestat ideea că gemenii MZ sunt cu adevărat identici și au forțat o reevaluare atât a metodologiei , cât și a rezultatelor obținute în studiile pe gemeni . Această cercetare a condus , de asemenea, la dezvoltarea de noi tehnici pentru studierea interacțiunilor dintre genotip și factorii de mediu.

Printre cele mai relevante descoperiri genomice despre gemeni, avem:

- La naștere, gemenii MZ nu au neapărat genomuri identice .
- Modelele de expresie ale gemenilor MZ se schimbă odată cu vârsta , ducând la diferențe fenotipice.

Să analizăm aceste puncte în ordine. În primul rând , gemenii MZ se dezvoltă dintr- un singur ovul fertilizat, în care, la un moment dat în stadiile incipiente ale dezvoltării, masa celulară rezultată se separă în două populații distincte, creând doi embrioni independenți . Până în acel moment, gemenii MZ au genotipuri identice. Cu toate acestea , ulterior, genotipurile lor pot diverge ușor. De exemplu, pot apărea diferențe în *variațiile numărului de copii* . (CNV-uri) — - variații ale numărului de copii ale numeroaselor secvențe lungi de ADN (de obicei 1000 de perechi de baze sau mai mult) — rezultând populații celulare distincte genetic în fiecare embrion (vezi Capitolul 8, pagina 229, pentru o explicație a variațiilor CNV). Aceasta creează

o afecțiune numită *mozaicism somatic,* care poate duce la un fenotip al bolii mai ușor în unele afecțiuni și poate juca un rol similar în discordanța fenotipică observată la unele perechi de gemeni MZ.

În prezent, este dificil de știut cu certitudine cât de frecvent apar CNV-urile după formarea gemenilor MZ, dar o estimare sugerează că astfel de diferențe apar la 10 % din perechile de gemeni. În perechile în care apar, o estimare este că o astfel de divergență afectează între 15 și 70% din celulele somatice. Într-un caz, s-a demonstrat că o diferență de CNV între gemenii MZ este asociată cu leucemia limfatică la un geamăn, dar nu la celălalt.

A doua diferență genomică între gemenii MZ implică - epigenetica - modificarea chimică a ADN-ului lor și a histonei asociate. Un studiu internațional al modificărilor epigenetice la gemenii MZ europeni adulți a demonstrat că gemenii MZ sunt epigenetic identici la naștere, dar prezintă diferențe semnificative în *modelele de metilare* atât ale ADN-ului, cât și ale histonelor. Astfel de modificări epigenetice, la rândul lor, afectează modelele de expresie genică . Acumularea de modificări epigenetice și profiluri de expresie genică poate explica parțial discordanța fenotipică și susceptibilitatea la boli observate la gemenii MZ adulți. O diferență în modelele de metilare a ADN-ului a fost observată la gemenii MZ discordanți pentru sindromul Beckwith-Wiedemann, o tulburare genetică asociată cu creșterea excesivă a anumitor țesuturi și organe în timpul dezvoltării și cu un risc crescut de cancer.

Modificările genomice progresive legate de vârstă pot rezulta din expunerea gemenilor MZ la diferiți factori de mediu sau din erori de marcare epigenetică după replicarea ADN-ului. Aceste descoperiri indică, de asemenea, că studiile de concordanță la gemenii DZ ar trebui să ia în considerare atât diferențele genetice, cât și cele epigenetice *care contribuie* la discordanța la aceste perechi de gemeni.

Înțelegerea faptului că epigenetica joacă un rol semnificativ în dezvoltarea fenotipurilor face ca studiile gemerilor să fie un instrument deosebit de valoros pentru analiza interacțiunilor genetice și a rolului factorilor de mediu în producerea fenotipurilor. Odată ce gradul de diferențe epigenetice dintre perechile de gemeni MZ și DZ este definit, studiile moleculare ale ADN-ului și modificării histonei pot lega modificările expresiei genelor de diferențele în ratele de concordanță dintre gemenii MZ și DZ.

ACUM REZOLVĂ ASTA |

23.3 Tabelul următor prezintă procentul de perechi de gemeni studiate în care ambele au exprimat același fenotip pentru o trăsătură (concordanță). Procentele se referă la trăsături diferite la gemenii monozigoți (MZ) și dizigoți (DZ). Presupunând că cei doi gemeni din fiecare pereche au fost crescuți împreună în același mediu, ce se poate concluziona despre importanța relativă a factorilor genetici față de cei de mediu pentru fiecare trăsătură?

Caracter	MZ (%)	DZ (%)
Grupele de sânge	100	66
Culoarea ochilor	99	28 de ani
Retardare mintală	97	37
Pojar	95	87
Culoarea părului	89	22
Dreapta/stânga	79	77
Epilepsia idiopatică	72	15
Schizofrenie	69	10
Diabet	65	18 ani
Alergie identică	59	5
Buză de iepure	42	5
Picioare strâmbe	32	3
Cancerul de sân	6	3

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să evaluăm importanța relativă a contribuțiilor factorilor genetici și de mediu în specificarea caracterelor , - examinând valorile de concordanță la gemenii MZ și DZ . Cheia rezolvării acestei probleme este examinarea diferenței dintre valorile de concordanță și luarea în considerare a ceea ce am învățat despre diferențele genetice dintre gemenii MZ și DZ.*

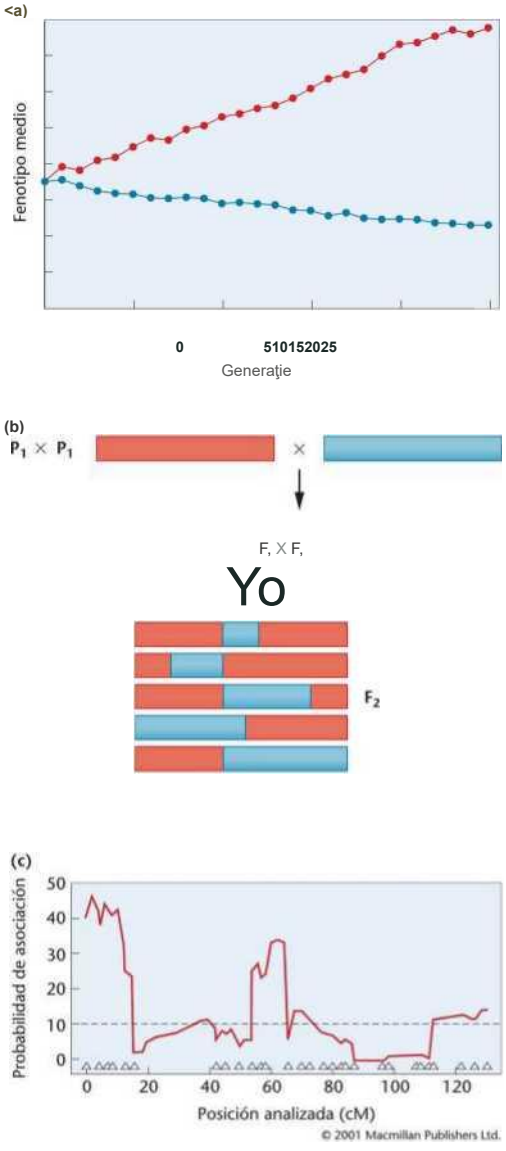
23,6

Locii trăsăturilor cantitative sunt utili în studiul fenotipurilor multifactoriale

Efectele asupra mediului , interacțiunea dintre alelele segregante și numărul mare de gene care pot contribui la un fenotip poligenic fac dificilă: (1) identificarea tuturor genelor implicate și (2) determinarea efectului fiecărei gene asupra fenotipului. Cu toate acestea, deoarece multe trăsături cantitative au importanță economică sau medicală, obținerea acestor informații este adesea de dorit . În astfel de studii, dacă se identifică o regiune cromozomială care conține una sau mai multe gene care contribuie la o trăsătură cantitativă, acea regiune se numește locus al trăsăturii cantitative (QTL). Atunci când este posibil, gena sau

genele relevante conținute într-un QTL sunt izolate și studiate.

Metoda modernă utilizată pentru localizarea și cartografierea QTL-urilor implică căutarea asocierilor dintre markerii ADN și fenotipuri. O modalitate de a face acest lucru este de a începe cu indivizi din două linii create prin selecție artificială, care sunt foarte divergente pentru un fenotip (greutatea fructului, conținutul de ulei, cantitatea de puf etc.). De exemplu, Figura 23.8 ilustrează un astfel de caz.



Cartografiere QTL generică . De-a lungul mai multor generații de selecție artificială , apar două linii divergente extrem de homozigote , facilitând utilizarea lor în cartografierea QTL . Indivizii din fiecare dintre aceste linii cu fenotipuri divergente [generația 25 din Figura 23.8(a)] sunt utilizați ca părinți pentru a crea o generație Fj ai cărei membri vor fi heterozigoți pentru majoritatea loci -urilor care contribuie la trăsătură. Încrucișările ulterioare , fie între indivizii Fj, fie între liniile consangvinizate Fj și cele parentale , au ca rezultat generații F2. care poartă diferite părți ale genomurilor parentale [Figura 23.8(b)] cu diferite genotipuri QTL și fenotipuri asociate . Această segregare în F2 Este cunoscută sub numele de mapare a populației QTL .

Cercetătorii măsoară apoi expresia fenotipică a *trăsăturii* la indivizii din populația cartografiată și identifică diferențele genomice dintre indivizi folosind markeri ADN specifici cromozomilor , cum *ar fi polimorfismele lungimii fragmentelor de* restricție (*RFLP*) . Pentru *microsateliți* și *polimorfisme cu un singur nucleotid* (*SNP),* consultați Capitolul 21. Pentru a determina relația dintre markeri și o componentă a variației fenotipice asociată cu o trăsătură, se utilizează analiza statistică *computerizată* . *Dacă un marker* ADN (cum ar fi cei menționați mai sus) *nu...* Dacă un marker ADN este legat de un QTL, atunci fenotipul mediu pentru trăsătură nu va varia între indivizii cu genotipuri diferite la acel locus al markerului. Cu toate acestea , dacă un marker ADN *este* legat de un QTL, atunci diferite genotipuri la acel locus al markerului vor diferi, de asemenea, în expresia fenotipică a trăsăturii. Când se întâmplă acest lucru , se spune că

FIGURA 23.8 (a) Indivizii din a 25-a generație de linii extrem de divergente , create prin selecție artificială, sunt selectați ca părinți . (b) Barele groase reprezintă genomurile indivizilor selectați ca părinți ai liniilor divergente. Acești indivizi sunt încrucișați pentru a produce o generație F1 (neprezentată). O generație F2 este produsă prin încrucișarea membrilor generației F2 . Ca urmare a încrucișării, membrii generației F2 poartă diferite părți ale genomului Pn , așa cum este indicat de segmentele colorate ale barelor groase . Se analizează markerii ADN și fenotipurile indivizilor din generația F2 . (c) Se utilizează metode statistice pentru a determina probabilitatea ca un marker ADN să fie asociat cu un QTL care afectează un fenotip. Rezultatele sunt reprezentate în grafic ca probabilitatea de asociere în funcție de localizarea cromozomială . Unitățile din hărțile genetice sunt exprimate în centimorgani (cM), determinate de frecvențele de încrucișare . Vârfurile de deasupra liniei orizontale reprezintă rezultate semnificative . Datele arată cinci posibile QTL-uri, cel mai semnificativ apărând la aproximativ 10 și 60 cM.

Locusul markerului și QTL-ul *se cosegregă.* Cosegregarea consistentă stabilește prezența unui QTL la sau în apropierea markerului ADN, undeva pe cromozom - cu alte cuvinte, markerul și QTL-ul sunt legate. Atunci când numeroase QTL-uri au fost localizate pentru o trăsătură, se creează o hartă genetică, arătând probabilitatea ca anumite regiuni cromozomiale să fie asociate cu fenotipul de interes [Figura 23.8(c)]. Investigații ulterioare, utilizând tehnici genomice, permit identificarea genelor din aceste regiuni care contribuie la fenotip.

Cartografierea QTL a fost utilizată pe scară largă în agricultură — inclusiv la plante precum porumbul, orezul, grâul și roșiile (Tabelul 23.5) — și în creșterea animalelor — inclusiv la bovine, porcine, ovine și puilor. De exemplu, sute de QTL-uri au fost cartografiate la tomate, iar genomul acestora a fost secvențiat. Au fost identificate multe regiuni cromozomiale responsabile pentru trăsături cantitative precum dimensiunea fructelor, conținutul de solide solubile și aciditatea. Aceste QTL-uri sunt distribuite pe cei 12 cromozomi care alcătuiesc genomul haploid al acestei plante.

TABLA 23.5

QTL-uri pentru fenotipuri cantitative identificat	Organisme	Fenotip cantitativ	QTL
	Tomate	Solide solubile	7
		Masă de fructe	13
		pH del fruto	9
		Crecimiento	5
		Forma de la hoja	9
		Altura	9
	Maíz	Altura	11
		Longitud de la hoja	7
		Producción de grano	18
		Número de espigas	10

Fuente: utilizado con permiso de Annual Reviews of Genetics, de «Mapping Polygenes» por S.D. Tanksley, *Annual Review of Genetici*, Vol. 27:205-233, Tabla 1, diciembre 1993. Permiso gestionado a través de Copyright Clearance Center, Inc.

Un program de cercetare condus de Steven Tanksley și colegii săi de la Universitatea Cornell s-a concentrat pe cartografierea și caracterizarea trăsăturilor cantitative ale roșiilor, inclusiv greutatea și forma fructelor . Vom descrie un aspect al acestei cercetări , care reprezintă o tehnică model pentru studiile QTL. În timp ce roșiile cultivate pot cântări până la 1.000 de grame , fructele speciilor sălbatice înrudite , considerate a fi strămoșii roșiilor moderne, cântăresc doar câteva grame [Figura 23.9(a)]. Cartografierea QTL a identificat peste 28 de QTL-uri asociate cu această variație de două ordine de mărime a greutății fructelor. A fost nevoie de peste zece ani de muncă pentru a localiza, identifica și clona unul dintre aceste QTL-uri, desemnat *fw2.2.*

(pe cromozomul 2). În cadrul acestui QTL, a fost identificată o genă specifică, ORFX, și s - *a* demonstrat că alelele de la acest locus sunt responsabile pentru aproximativ 30 % din variația dimensiunii fructelor.

Gena ORFX a fost izolată, clonată și transferată cu succes între plante , cu rezultate foarte interesante. O alelă a *genei ORFX* este prezentă în toate soiurile investigate de roșii sălbatice cu fructe mici, în timp ce o altă alelă este prezentă în toate soiurile domestice cu fructe mari. Atunci când o genă *ORFX* clonată din soiurile cu fructe mici este transferată la o plantă care produce în mod normal roșii mari, planta transformată produce fructe cu o greutate semnificativ redusă [Figura 23.9(b)]. În soiurile studiate de echipa lui Tanksley , s-a observat o reducere medie de 17 grame, o modificare fenotipică semnificativă statistic cauzată de acțiunea unei gene aparținând unui singur QTL.

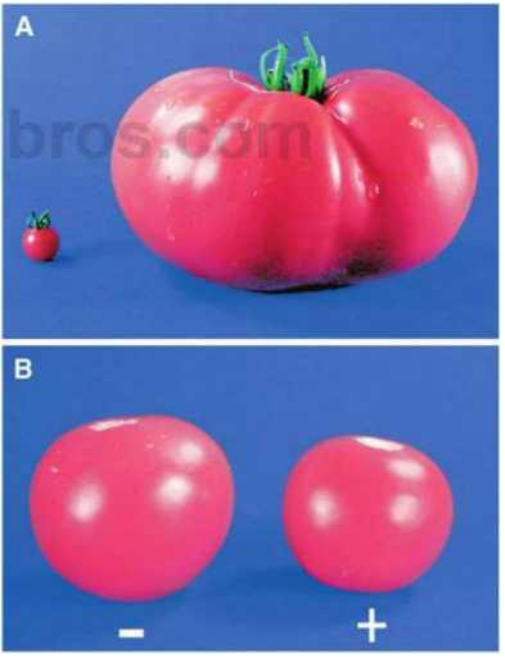


FIGURA 23.9 (a) Tomates ancestral y actual, (b) Efecto fenotípico del transgén *fw2.2* en el tomate. Cuando el alelo que da lugar a fruto pequeño se transfiere a una planta que normalmente produce fruto grande, el tamaño del fruto se reduce (+). Se muestra un fruto de control (—), que no ha sido transformado, con fines comparativos.

O analiză suplimentară a genei *ORFX* a relevat că aceasta codifică o proteină ce reglează negativ diviziunea celulară în timpul dezvoltării fructelor. Diferențele în momentul expresiei genelor și cantitatea de transcript produs determină dimensiunea fructelor. Nivelurile mai ridicate de expresie mediate de alelele *ORFX transferate* exercită un control negativ asupra diviziunii celulare, rezultând roșii mai mici.

Cu toate acestea, gena *ORFX* și alte gene înrudite nu explică pe deplin variația observată în dimensiunea roșiilor. Analiza unui alt QTL, *fas* (situat pe cromozomul 11), indică faptul că dezvoltarea unor diferențe extreme în dimensiunea fructelor datorită selecției artificiale implică și o creștere a numărului de compartimente în fructul matur. Soiurile ancestrale cu fructe mici produc fructe cu două până la patru compartimente pentru semințe, în timp ce soiurile actuale cu fructe mari au opt sau mai multe compartimente. Prin urmare, QTL-urile care afectează dimensiunea fructelor la roșii funcționează prin controlul a cel puțin două procese de dezvoltare: diviziunea celulară în stadiile incipiente ale dezvoltării și determinarea numărului de compartimente ovariene.

Descoperirea faptului că QTL-urile pot controla nivelurile de expresie genică a condus la noi definiții moleculare ale fenotipurilor asociate cu trăsături cantitative. De exemplu, fenotipul investigat ar putea fi cantitatea unui transcript ARN produs de o genă (QTL de expresie sau eQTL) sau cantitatea de proteină produsă (QTL proteic sau pQTL). Aceste fenotipuri moleculare sunt controlate poligenic în același mod ca majoritatea fenotipurilor convenționale , cum ar fi greutatea fructelor . De exemplu, expresia genelor este controlată de factori cis , inclusiv promotori, și de factori de transcripție trans (vezi Capitolul 17 pentru o expunere a reglării genelor la organismele eucariote) .

Utilizarea acestor noi metode de analiză QTL propulsează acest domeniu într- o nouă direcție, concentrându-se pe rețelele de reglare , interacțiunile proteină-proteină și biologia sistemelor . În biologia plantelor , eQTL-urile sunt utilizate pentru a studia timpul de înflorire , rezistența la agenți patogeni și influența mediului asupra evenimentelor de dezvoltare. Aceste noi metode se vor dovedi utile nu numai pentru agricultură , ci și în alte domenii, inclusiv studiul trăsăturilor și bolilor umane multifactoriale , cum ar fi labioschizisul , spina *bifida* , *diabetul de tip II* și cardiopatia *ischemică* .

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

Revoluția verde din nou: cercetare genetică cu orez

Dintre cei peste **6,7** miliarde **de oameni** care locuiesc pe **Pământ** , aproximativ **800 de milioane nu au suficientă mâncare. Se așteaptă ca acest număr să crească cu 1 milion de oameni pe an în următoarele câteva decenii . Cum vom putea hrăni cei 8 miliarde de oameni** care vor locui pe Pământ în 2025?

Trecutul ne oferă câteva motive **să** fim optimiști. În anii 1950 *și* 1960, confruntați cu **amenințarea** creșterii populației, specialiștii în plante din întreaga **lume** au început să crească randamentele culturilor , inclusiv **ale celor trei** cereale cele mai **importante** : grâul, orezul *și* porumbul. Aceste eforturi **au devenit** cunoscute sub numele *de* Revoluția **Verde** . **Abordarea** a fost triplă: **(1) creșterea utilizării îngrășămintelor, pesticidelor și sistemelor de irigații; (2) pregătirea mai multor terenuri pentru cultivare și (3) dezvoltarea de soiuri** îmbunătățite de plante **cultivate** prin **ameliorarea intensivă a plantelor .**

Rezultatele au fost spectaculoase. Țările în curs de dezvoltare au reușit să-și dubleze producția de orez, grâu **și** porumb între **1961 și 1985.** Țările care **s-au confruntat** cu foametea în anii **1960 au reușit** să se hrănească singure **și au devenit principalii - exportatori de cereale.**

Revoluția Verde a salvat milioane de oameni de la foamete și a îmbunătățit calitatea vieții pentru multe alte milioane; cu toate acestea, efectele sale s-ar putea să se estompeze. Ritmul de creștere a producției de cereale a încetinit din 1980, din cauza încetinirii extinderii irigațiilor și a utilizării îngrășămintelor . Dacă producția alimentară va ține pasul cu creșterea preconizată a populației lumii , ne vom baza din ce în ce mai mult pe tehnici de ameliorare genetică pentru plantele cultivate pentru a obține randamente mai mari . Dar este este posibil acest lucru sau ne apropiem deja de limitele teoretice ale productivității pentru culturile majore ? Studii recente asupra orezului sugerează că răspunsul la această întrebare este un nu răsunător .

Aproximativ jumătate din populația lumii se bazează pe orez

ca aliment de bază . Revoluția Verde pentru orez a început în 1960, susținută de Institutul Internațional de Cercetare a Orezului (IRRI) . Una dintre principalele dezvoltări a fost cultivarea unui soi de orez îmbunătățit , rezistent la boli și cu productivitate mai mare. Echipa de cercetare IRRI a încrucișat un soi de orez chinezesc (Dee - geo - *woo-gen)* . cu o varietate indoneziană (*Peta)* pentru a crea o nouă varietate cultivată, cunoscută sub numele de IR8. IR8 produce un număr mare de boabe de orez pe plantă atunci când este cultivată cu îngrășăminte și irigații suficiente. În cadrul acestor practici de cultivare , plantele IR8 rezultate erau foarte înalte, cu boabe care tindeau să se așeze - o caracteristică cunoscută sub numele de „cădere". *Pentru a reduce* această cădere , experții IRRI au încrucișat IR8 cu o varietate pitică nativă pentru a crea linii semi -pitice. Datorită parțial adoptării liniilor semi- pitice IR8 , producția globală de orez s-a dublat în 25 de ani.

Predicțiile sugerează că o creștere de 40 % a recoltei anuale de orez ar putea fi necesară pentru a ține pasul cu creșterea populației în următorii 30 de ani. Cu cât terenul și apa devin mai rare și cu cât prețurile îngrășămintelor și pesticidelor cresc , cu atât va trebui depus un efort mai mare pentru a crea noi soiuri de orez care să ofere randamente mai mari și o rezistență mai mare la boli .

Geneticienii utilizează în prezent mai multe strategii pentru a dezvolta un orez mai productiv. Tehnicile convenționale de ameliorare și hibridizare , cum ar fi cele - utilizate pentru a crea soiul IR8 , continuă să producă soiuri care contribuie la o creștere a productivității între 1 și 10 % pe an. Mai multe loci cantitativi de trăsături (QTL) la orezul sălbatic par să contribuie la randamente mai mari , iar oamenii de știință încearcă să - introducă aceste trăsături în soiurile pitice normale de orez domesticit . Genomica și ingineria genetică contribuie, de asemenea, la noua Revoluție Verde a orezului. În 2002, a fost secvențiat primul genom de cereale - genomul orezului. Cercetarea se concentrează acum pe determinarea funcției tuturor genelor din genomul orezului . Odată identificate și caracterizate , aceste gene pot fi transferate plantelor , accelerând dezvoltarea soiurilor de orez cu trăsături dorite, cum ar fi rezistența la boli , toleranța la secetă și salinitate și un conținut nutrițional îmbunătățit .

Rândul tău

I. Acordați-vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a vă ajuta să înțelegeți unele dintre tehnologiile și problemele legate de noua Revoluție Verde .

1. Cum credeți că vor contribui genomica și ingineria genetică la dezvoltarea unor soiuri de orez mai productive?

Puteți găsi o sursă de informații pe această temă în Khush, GS 2005. Ce va fi necesar pentru a hrăni 5,0 miliarde de consumatori de orez în 2030. *Plant Mol Biol.* 59: 1-6.

2. O complicație serioasă în eforturile noastre de a hrăni populația Pământului este schimbarea climatică. Având în vedere previziunile actuale - privind schimbările climatice, ce trăsături ar trebui să introducem în - plantele de orez și ce metode putem folosi pentru a face acest lucru?

Pentru a afla mai multe despre efectele - schimbărilor climatice globale asupra agriculturii, citiți Battisti, DS și Naylor, RL 2009. Avertismente istorice privind insecuritatea alimentară viitoare cu căldură sezonieră fără precedent. Science 323: 240-244. *Căutați și „schimbări climatice" pe site-ul Institutului Internațional de Cercetare a Orezului* (http://www.irri.org).

3. În ciuda beneficiilor sale, Revoluția Verde a fost subiectul unor controverse. Care sunt principalele critici aduse Revoluției Verzi și cum putem atenua unele dintre aspectele sale negative ?

Puteți *găsi un rezumat al criticilor aduse Revoluției Verzi pe site-ul Wikipedia* (http://en.wikipedia.org/wiki/Green_revolution *sau în spaniolă la* es.wikipedia.org/wiki/Révolucion_verde).

ȘI STUDIU DE CAZ | Timpul este totul

11 iulie 2008 , germanul Stephan Gerth și ghanezul Addo Gerth au avut doi fii gemeni . Stephan are pielea foarte albă , ochi albaștri și părul drept ; Addo are pielea închisă la culoare, ochi căprui și părul creț . Primul născut , Ryan, are pielea albă , dar nu la fel de deschis ca Stephan, are ochi albaștri și părul drept ; fratele său, Leo, are pielea puțin mai închisă la culoare , ochi căprui și părul creț . Deși textura părului și culoarea ochilor ambilor gemeni erau aceleași cu cele ale unuia sau celuilalt părinte, gemenii aveau tonuri de piele diferite , o nuanță intermediară între culorile pielii părinților lor . Experții au explicat că efectul de amestecare a culorii pielii gemenilor a fost rezultatul moștenirii cantitative care implică cel puțin trei perechi diferite de gene, în timp ce textura părului și culoarea ochilor nu sunt moștenite cantitativ. Folosind acest lucru ca exemplu de genetică cantitativă, putem pune următoarele întrebări:

1. Ce metodă se folosește pentru a estima câte perechi de gene sunt implicate într-o trăsătură cantitativă? De ce ar fi

extrem de dificil acest lucru în cazul culorii pielii la oameni?
2. Ar fi necesar ca unul dintre părinți să aibă strămoși metiși pentru ca gemenii să fie atât de diferiți?
3. un milion ca gemenii să prezinte unele caracteristici ale părinților lor (textura părului, culoarea ochilor), dar un amestec de alte caracteristici (culoarea pielii, în acest caz) ?

Puntos de resumen

1. Moștenirea cantitativă are ca rezultat o gamă largă de fenotipuri datorită efectului alelelor aditive a două sau mai multe gene, combinate cu factorii de mediu.
2. Pentru a analiza caracteristicile cantitative, se utilizează metode statistice, inclusiv media , varianța, deviația standard, eroarea standard, covarianța și coeficientul de corelație.
3. Eritabilitatea este o estimare a contribuției relative a factorilor genetici la factorii de mediu în intervalul de variație fenotipică observat într -o trăsătură cantitativă în cadrul unei anumite populații și medii.
4. Studiile pe gemeni sunt utilizate pentru a estima ereditabilitatea trăsăturilor umane multifactoriale.
5. Loci-urile caracterelor cantitative sau QTL-urile pot fi identificate și mapate folosind markeri ADN.

Pentru a vizualiza activități, animații și întrebări de recapitulare, consultați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

1. La o anumită plantă, înălțimea acesteia variază între 6 și 36 cm. Când plantele de 6 cm au fost încrucișate cu plante de 36 cm , toți urmașii F1 au măsurat 21 cm. În generația F2 S-a observat o gamă continuă de înălțimi. Multe dintre ele aveau aproximativ 21 cm înălțime , iar 3 din 200 erau la fel de scunde ca exemplarul -părinte (6 cm) .

   (a) Care este modul de moștenire și câte perechi de gene sunt implicate?
   (b) Cât contribuie fiecare alelă aditivă la înălțime?
   (c) Enumerați toate genotipurile care au ca rezultat plante cu o înălțime de 31 cm.

   Soluție
   (a) Moștenirea poligenică apare atunci când este implicată o trăsătură continuă și când alelele contribuie aditiv la fenotip. Raportul 3/200 al plantelor F2 este esențial pentru determinarea numărului de perechi de gene . Acesta se reduce la un raport de 1/66,7 (care este foarte apropiat de 1/64). Folosind formula 1/4 = 1/64 (unde 1/64 este egal cu proporția fenotipurilor F2) la fel de extremă ca oricare dintre părinții P ( ), n = 3. Prin urmare, sunt implicate trei perechi de gene.
   (b) Variația dintre cele două fenotipuri extreme este

   36 - 6 = 30 cm

   Deoarece există șase alele aditive potențiale *(AABBCC),* fiecare contribuie cu,

   30/6 = 5 cm

   la o înălțime a bazei de 6 cm, ceea ce apare atunci când nicio alelă aditivă (*aabbcc)* nu face parte din genotip.
   (c) Toate genotipurile care includ cinci alele aditive vor avea o înălțime de 31 cm (5 alele x 5 cm/alelă + 6 cm înălțimea bazei = 31 cm). Prin urmare, *AABBCc, AABbCC* și AaBBCC Acestea vor fi genotipurile care vor produce plante cu 31 cm.

2. La o intersecție independentă a punctelor de trecere F (Așa cum s-a menționat mai sus , s-a efectuat o încrucișare de testare pe o plantă cu fenotip și genotip necunoscute , obținându-se următoarele rezultate

   1/4 11 cm

   2/4 16 cm

   1/4 21 cm

   Un student sârguincios la genetică și-a dat seama că planta necunoscută putea avea un singur fenotip, dar putea avea oricare dintre cele trei genotipuri posibile. Care sunt acestea?

   Soluție. Când se efectuează încrucișarea de testare (cu *aabbcc)* , planta necunoscută poate contribui cu una, două sau trei dintre alelele aditive ale gameților săi pentru a produce cele trei fenotipuri de urmași . Deoarece nu se observă niciun urmaș cu o înălțime de 6 cm, planta necunoscută nu contribuie niciodată cu toate alelele sale neaditive *(abe).* Doar plantele homozigote pentru un locus și heterozigote pentru celelalte două vor îndeplini aceste criterii. Prin urmare , părintele necunoscut poate avea oricare dintre următoarele trei genotipuri , toate având un fenotip de 26 cm:

   AABbCc
   AaBbCC
   AaBBCc

   De exemplu, în primul genotip *(AABbCc)* ,

   AABbCc X *aabbcc*

   legume și fructe

1/4 *AaBbCc*	21 cm
1/4 *AaBbcc*	16 cm
1/4 *AabbCc*	16 cm
1/4 *Aabbcc*	11 cm

   cum să observi corect fenotipurile .

3. Următorul tabel prezintă media și varianța lungimii corolei pentru două soiuri de *Nicotiana cu încrucișări mari și urmașii acestora. Un părinte (P1) are o corolă scurtă* , iar celălalt părinte (P2) are o corolă lungă. Calculați ereditabilitatea în sens larg *(H2) a* lungimii corolei la această plantă.

Varietate	Medie (mm)	Varianță (mm)
P, scurt	40,47	3.12
P 2 lung	93,75	3,87
F, (P, XP 2)	63,90	4,74
F2 (F, X F.)	68,72	47,70

Soluție : Formula pentru estimarea ereditabilității este $H^2 = VJ/VP$, *unde VG* și *Vr* sunt *componentele* variației genetice și respectiv fenotipice . Principala problemă în această problemă este de a obține o estimare a celor două componente ale variației fenotipice: factorii genetici și cei de mediu. *Vp* este combinația varianțelor genetice și de mediu . Deoarece ambele soiuri parentale sunt de rasă pură, se presupune că sunt homozigote, iar variațele de 3,12 și 3,87 sunt considerate rezultatul influenței mediului. Media acestor două valori este 3,50. F (este, de asemenea, omogenă genetic și ne oferă o estimare suplimentară a impactului factorilor de mediu . Mediind această valoare cu cea a părinților ,

$$\frac{4,74 + 3,50}{}$$

Obținem o idee *relativ* bună despre impactul mediului asupra fenotipului . Varianța fenotipică în F2 este suma componentelor genetice (*Vc*) . și de mediu (V_F) . Am estimat componenta de mediu la 4,12, deci 47,7 minus 4,12 ne dă o estimare a *lui V* (, care este 43,58. Prin urmare, ereditabilitatea este 43,58/47,70, adică 0,91 . Această valoare, interpretată ca procent , indică faptul că aproximativ 91 % din variația lungimii corolei se datorează influențelor genetice .

Probleme și întrebări pentru discuții

DE CUM ȘTIM ? |

1. , ne-am concentrat asupra modului de moștenire cunoscut sub numele de genetică cantitativă, precum și asupra numeroșilor parametri statistici utilizați pentru a studia trăsăturile cantitative . Pe parcursul acestui proces, am avut numeroase ocazii să analizăm metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) De unde știm că trăsăturile prag sunt cu adevărat poligenice, chiar dacă pot avea puține clase fenotipice discrete sau chiar doar două?
   (b) Cum putem afla numărul de poligene implicate în moștenirea unei trăsături cantitative ?
   (c) Ce descoperiri i-au determinat pe geneticieni să postuleze ipoteza factorilor multipli, care invocă ideea alelelor aditive pentru a explica modelele de moștenire ?
   (d) Cum evaluăm factorii de mediu pentru a determina dacă aceștia au un impact asupra fenotipului unei trăsături moștenite cantitativ?
   (e) De unde știm că gemenii monozigoți nu sunt genotipic identici la vârsta adultă?

2. Care este diferența dintre variația continuă și cea discontinuă? Care dintre cele două este mai probabil să fie rezultatul moștenirii poligenice ?
3. Definiți următorii termeni: (a) poligenic, (b) alele aditive , (c) corelație, (d) gemeni monozigoți și dizigoți, (e) ereditabilitate și (f) QTL.
4. varietate de grâu roșu închis este încrucișată cu o varietate albă și un soi F (de culoare roșie intermediară . Când plantele F1 sunt încrucișate pentru a obține o varietate îmbunătățită , se obține o generație F2 cu un raport de 1 roșu închis: 4 roșu mediu închis: 6 roșu mediu : 4 roșu deschis : 1 alb . Încrucișările ulterioare au relevat că plantele F2 Cele roșii închise și cele albe erau soiuri pure.

   (a) Pe baza proporțiilor populației F2 , câte gene sunt implicate în producerea culorii?
   (b) Câte alele aditive sunt necesare pentru a produce fiecare fenotip posibil?
   (c) Atribuiți simboluri acestor alele și enumerați posibilele genotipuri care au ca rezultat fenotipurile intermediare roșu și roșu deschis.
   (d) Preziceți rezultatul în generațiile F1, F2 și F3 al unei încrucișări între o plantă roșie intermediară și o plantă albă.

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

5. Înălțimea la oameni depinde de acțiunea genelor aditive. Presupunem că această trăsătură este controlată de patru loci, R, S, T și U, și că efectele asupra mediului sunt neglijabile. În loc de alele aditive și neaditive , presupunem că există alele aditive și parțial aditive . Alelele aditive contribuie cu două unități la înălțime , iar alelele parțial aditive contribuie cu o unitate.
   (a) Pot doi indivizi de înălțime medie să aibă urmași mult mai înalți sau mult mai scunzi decât oricare dintre părinți ? Dacă da, cum?
   (b) Dacă un individ cu înălțimea minimă specificată de aceste gene se căsătorește cu un alt individ de înălțime intermediară, poate vreunul dintre copiii săi să fie mai înalt decât părintele înalt? De ce sau de ce nu ?
6. O varietate consangvinizată de plante are o înălțime medie de 24 cm. O a doua varietate din aceeași specie, dintr -o regiune geografică diferită, are, de asemenea, o înălțime de 24 cm. Când plantele din cele două tulpini sunt încrucișate, plantele F1 au aceeași înălțime ca plantele-mamă. Cu toate acestea , în generația F2, există o gamă largă de înălțimi; majoritatea sunt similare cu plantele P1 și F1, dar aproximativ 4 din fiecare 1.000 au doar 12 cm înălțime, iar alte 4 din fiecare 1.000 au 36 cm înălțime.
   (a) Ce fel de moștenire are loc aici ?
   (b) Câte perechi de gene sunt implicate?
   (c) Cât contribuie fiecare genă la înălțimea plantei?
   (d) Indicați un posibil grup de genotipuri de plante P (și F) care ar putea explica aceste rezultate.

(e) Precizați trei genotipuri posibile care ar putea explica producerea plantelor F, înalte de 18 cm și trei care explică producerea plantelor F , înalte de 33 cm.

7. Erma și Harvey erau o pereche de purcei care se înțelegeau foarte bine, dar cu un aspect curios. Coada lui Harvey avea doar 6 cm lungime, în timp ce a Ermei avea 30 cm. Toți purceii lui Fj aveau cozi de 18 cm. Când aceștia au fost încrucișați, generația F2 (nepoții Ermei și ai lui Harvey) era foarte numeroasă, iar purceii aveau cozi care variau în trepte de 4 cm , între 6 și 30 cm (adică, cu lungimi de 6, 10, 14, 18, 22, 26 și 30 cm). Majoritatea aveau cozi de 18 cm, în timp ce 1/64 avea cozi de 6 cm, iar un alt 1/64 avea cozi de 30 cm.
(a) se moștenește lungimea cozii , descriind modul de moștenire , precizând câte perechi de gene sunt implicate și desemnând genotipurile Ermei și Harvey și ale urmașilor lor cu cozi de 18 cm .
(b) unul dintre porcii F1 cu o coadă de 18 cm este încrucișat cu un alt porc F2 cu o coadă de 6 cm , ce raport fenotipic ar fi de așteptat dacă s-ar obține mulți urmași? Desenați o diagramă a încrucișării.

8. Următorul tabel compară diferențele medii de înălțime, greutate și număr de creste amprentale între gemenii monozigoți (crescuți împreună și separat), gemenii dizigoți și frații/surorile non-gemeni :

Caracter	MZ crescute împreună	MZ ridicat separat	DZ crescute împreună	Frați crescuți împreună
Înălțime (cm)	1.7	1.8	4.4	4.5
Greutate (kg)	1.9	4.5	4.5	4.7
Număr de creste	0,7	0,6	2.4	2.7

Pe baza acestor date, care dintre aceste trăsături cantitative are cea mai mare valoare de ereditabilitate ?

9. Ce tipuri de estimări ale ereditabilității (în linii mari sau înguste) se obțin din studiile pe gemeni la oameni?
10. Enumerați cât mai multe caracteristici umane posibil care sunt susceptibile de a fi sub controlul unui mod poligenic de moștenire.
11. Într -un test pe parcelă , plantele de porumb au fost măsurate , iar distribuția înălțimilor la intervale de 10 cm s-a dovedit a fi așa cum se arată în tabelul următor:

Înălțime (cm)	Numărul de plante
100	20
110	60
120	90
130	130
140	180
150	120
160	70
170	50
180	40

Calculați (a) înălțimea medie, (b) varianța, (c) deviația standard și (d) eroarea standard a mediei . Reprezentați grafic frecvența în funcție de înălțimea plantei. Valorile reprezintă o distribuție normală? Pe baza calculelor dvs., cum ați evalua variația în cadrul acestei populații?

12. Următoarele variațe au fost calculate pentru două trăsături într-o turmă de porci.

Caracter	V,	ГС	MERGE
Grăsime de șold	30,6	12.2	8.44
Lungimea corpului	52,4	26,4	11,70

(a) Calculați ereditabilitatea în sens larg (H2) și în *sens* restrâns (h2) pentru fiecare trăsătură a acestei turme.
(b) Care dintre cele două trăsături va răspunde mai bine la selecția unui crescător interesat de îmbunătățirea productivității ? De ce ?

13. Următorul tabel detaliază media și varianța înălțimii plantelor pentru două soiuri cu consangvinitate ridicată (P t și Pj) și ai descendenților săi (F (și F2) .

Varietate	Medie (cm)	Varianță
PT	34.2	4.2
P.;	55,3	3.8
F,	44.2	5.6
F,	46,3	10.3

Calculați ereditabilitatea în sens larg (H2) a înălțimii plantelor la aceste specii .

14. Un studiu ipotetic a investigat cantitatea de vitamina A și colesterol din ouăle unei populații mari de găini. Variațele calculate (V) sunt prezentate mai jos:

Varianță	Vitamina A	Caracterul colesterolului
	123,5	862,0
MERGE	96,2	484,6
	12.0	192.1
Eu sau	15.3	185,3

(a) Calculați ereditabilitatea în sens strict (/i²) pentru ambele trăsături .
(b) Care dintre ei, dacă există vreunul, este cel mai probabil să răspundă la selecție?

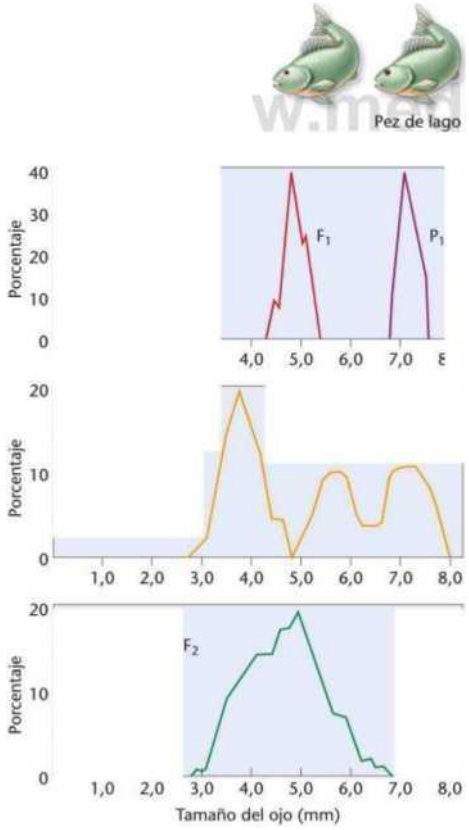
15. Într -o turmă de vaci de lapte , ereditabilitatea strictă pentru conținutul de proteine din lapte este de 0,76 , iar pentru conținutul de grăsime din lapte este de 0,82. Coeficientul de corelație dintre conținutul de proteine și conținutul de grăsime din lapte este de 0,91. Dacă fermierul selectează vaci cu un conținut mai mare de grăsime din lapte , care va fi cel mai probabil efect asupra conținutului de proteine din lapte în următoarea generație ?
16. În evaluarea învățării la *Drosophila,* mușteleț pot fi antrenate să evite anumite indicii olfactive. Într -o populație, a fost necesară o medie de 8,5 încercări . Mușteleț dintr -un subgrup al acestei populații care au învățat mai repede (medie -6,0) au fost încrucișate între ele , iar urmașii lor au fost examinați . Aceste muște au prezentat un scor mediu de învățare de 7,5 . Calculați ereditabilitatea realizată a învățării olfactive la Drosophila .
17. Să presupunem că vrei să dezvolți o populație de *Drosophila* care învață rapid să evite anumite substanțe pe care mușteleț le pot detecta prin miros. Pe baza estimării ereditabilității din Problema 16, crezi că ar merita să faci acest lucru prin selecție artificială? De ce sau de ce nu ?

18. Într-o populație de plante de tomate , greutatea fructului este de 60 g, iar *h1* este egal cu 0,3. Preziceți greutatea medie a urmașilor dacă plantele de tomate ale căror fructe au o greutate medie de 80 g sunt selectate din populația inițială și încrucișate între ele.
19. Într -o populație de 100 de plante de orez consangvinizate și genotipic identice , varianța producției de boabe este de 4,67. Care este ereditabilitatea producției? Ați recomanda unui cultivator de orez să îmbunătățească productivitatea acestei varietăți de plante de orez prin selecție?
20. Multe trăsături de importanță economică și medicală sunt determinate de loci cantitativi ai trăsăturilor (QTL) în care multe gene, în mod normal dispersate în întregul genom, contribuie la exprimare.
(a) Ce proceduri generale sunt utilizate pentru identificarea unor astfel de loci?
(b) Ce înseamnă termenul *„co-segregat"* în contextul cartografierii QTL? De ce sunt adesea utilizați markeri precum RFLP-uri, SNP-uri și microsateliți în cartografierea QTL?

Probleme suplimentare picante

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

21. În 1988 , Horst Wilkens a investigat un pește-peșteră orb, comparându -l cu membrii unei specii gemene cu vedere normală găsiți într-un lac (Wilkens, H. (1988). *Ecol. Biol.* 23: 271-367). Ne vom referi la ei ca pești-peșteră și pești-lac. Wilkens a descoperit că ochii peștilor-peșteră erau de aproximativ șapte ori mai mici decât ochii peștilor -lac . Hibrizii F1 aveau ochi de dimensiuni intermediare. Aceste date, precum și rezultatele încrucișărilor Fj x F1 și ale încrucișărilor (Fj x pește-peșteră și Fj x pește-lac), sunt prezentate în figura următoare .



Examinați rezultatele lui Wilkens și răspundeți la următoarele întrebări :
(a) Bazat strict pe rezultatele din F și F_2 Dintre încrucișările Wilkens inițiale , care este cea mai plauzibilă explicație pentru moștenirea dimensiunii ochilor ?
(b) Pe baza rezultatelor încrucișării dintre peștele -peșteră și F , acestea susțin explicația ta ? Explică -ți răspunsul.
(c) Pe baza rezultatelor încrucișării dintre peștele de lac și F |, acestea susțin explicația ta ? Explică -ți răspunsul.
(d) Wilkens a examinat aproximativ 1.000 de descendenți ai generației F2 și a estimat că 6 până la 7 gene au fost implicate în determinarea -dimensiunii ochilor . Este dimensiunea eșantionului adecvată pentru a justifica această concluzie ? Propuneți un protocol experimental pentru a testa această ipoteză.
(e) Comparând ochii embrionilor de pești de peșteră și pește-lac , s-a observat că ambii au atins un diametru aproximativ de 4 mm . Cu toate acestea, ochii peștelui -lac au continuat să crească, în timp ce cei ai peștelui-lac s-au micșorat considerabil . Se pot face specule asupra rolului genelor implicate în această diferență .

O plantă de 3 cm a fost încrucișată cu o plantă de 15 cm , iar toate plantele Fj obținute aveau 9 cm. În F2 , plantele au prezentat o „ distribuție normală ", cu înălțimi de 3, 4, 5, 6, 7, 8 , 9 , 10 , 11, 12, 13, 14 și 15 cm.
(a) Ce proporții vor constitui „ distribuția normală" în F?
(b) Ce rezultate se vor obține dacă plantele F (Sunt încrucișate cu plante homozigote pentru toate alelele neaditive ?

23. Într-o încrucișare între o rasă mare de cobai și o rasă mică de cobai, generația F2 a fost fenotipic uniformă, cu o dimensiune medie aproximativ intermediară între cele două rase-mamă. Dintre cei 1014 indivizi din generația F2 , 3 aveau aproximativ aceeași dimensiune ca rasa -mamă mai mică , iar 5 aveau aproximativ aceeași dimensiune ca rasa - mamă mai mare . Câte perechi de gene sunt implicate în moștenirea mărimii la aceste rase de cobai ?
24. Brahidactilia de tip A1B (falangele medii scurte) este o trăsătură -determinată genetic, situată pe brațul scurt al cromozomului 5 la om . Atunci când indivizii sunt clasificați în funcție de prezența sau nu a brahidactiliei, trăsătura pare să depindă de un singur locus, cu un model de moștenire parțial dominant . Cu toate acestea , examinarea degetelor de la mâini și de la picioare ale indivizilor afectați relevă o gamă largă de expresie , de la degete foarte scurte la degete doar ușor scurte . Ce ar putea cauza o astfel de variație în expresia brahidactiliei?

25. Într-o serie de încrucișări între două soiuri pure de piersici , generația F1 a fost uniformă, producând piersici cu o greutate de 30 de grame. Greutatea fructelor F2 a variat între 38 și 22 de grame , cu intervale de 2 grame.
(a) Folosind aceste date, determinați numărul de loci poligenici implicați în moștenirea greutății piersicii .
(b) Folosind simboluri pentru genele alese , furnizați genotipurile părinților și ale lui F () .

26. Studenții dintr-un laborator de genetică au întreprins un experiment - pentru a încerca să crească toleranța la căldură la două varietăți de *Drosophila melanogaster.* O varietate fusese capturată în sălbăticie cu șase săptămâni înainte de începerea experimentului; cealaltă a fost obținută din colecția de Drosophila disponibilă în laboratorul universității. La ce varietate v-ați *aștepta* la un răspuns mai rapid și mai răspândit la selecția pentru toleranța la căldură? De ce?

27. Să luăm în considerare o plantă de rasă pură , *AABBCC,* încrucișată cu o altă plantă de rasă pură, aabbcc , urmașul rezultat fiind *AaBbCc. Dacă* generația F1 este încrucișată unde regula este sortimentul independent , fracția așteptată de urmași din fiecare clasă fenotipică este dată de expresia N!/|Af!(N - *M* !)], unde *N* este numărul total de alele (șase în acest exemplu), iar *M* este numărul de alele majuscule. Într-o încrucișare AaBbCc × AaBbCc , ce proporție de urmași ar fi de așteptat să aibă două alele majuscule?

28. Displazia de șold canină este o trăsătură cantitativă care continuă să afecteze majoritatea raselor de câini de talie mare , în ciuda a 40 de ani de eforturi pentru a-i reduce impactul . Crescătorii și medicii veterinari se bazează pe înregistrări genealogice și radiografii pentru a facilita dezvoltarea programelor de reproducere care vizează reducerea incidenței acesteia. Datele (Wood și Lakhani, 2003. *Vet Ree.* 152:69-72) indică un efect al „lunii nașterii " asupra displaziei de șold la Labrador Retriever și Gordon Setter, unde frecvența și gradul de exprimare a acestei tulburări variază în funcție de perioada anului în care se nasc câinii. Speculați despre modul în care crescătorii vor încerca să elimine această tulburare prin „selecție" și ce indică fenomenul lunii nașterii despre exprimarea trăsăturilor poligenice .

29. Trăsăturile florale ale plantelor joacă adesea roluri importante în diversificare , unde modificări minore ale acestor trăsături, dacă sunt determinate genetic, pot duce rapid la constrângeri evolutive și reproductive . Înțelegerea modului în care genetica este implicată în formarea florilor se obține adesea prin experimente de selecție care demonstrează ereditabilitate realizată. Lendvai și Levin (2003) au efectuat o serie de experimente de selecție artificială asupra dimensiunii (diametrului) florilor la *Phlox drummondii.* Datele din aceste experimente de selecție sunt detaliate în tabelul următor .

An	Tratament	Medie (mm)
1997	Controla	30.04
	Părinți selectați	34.13
	Descendenți	32.21
1998	Controla	28.11
	Părinți selectați	31,98
	Descendenți	31,90
1999	Controla	29,68
	Părinți selectați	31,81
	Descendenți	33,74

(a) Considerând că diferențele valorilor de control reprezintă diferențele de la an la an în condițiile de seră, calculați (în mm) răspunsul mediu la selecție pe o perioadă de trei ani.
(b) Calculați ereditabilitatea realizată pentru fiecare an și - ereditabilitatea totală.
(c) Presupunând că ereditabilitatea realizată la *Phlox* este relativ - ridicată , ce factori pot explica acest răspuns ridicat?
(d) În ceea ce privește potențialul evolutiv, va fi favorizată o populație cu ereditabilitate ridicată în comparație cu o altă populație cu ereditabilitate realizată scăzută?

Nematoda *Caenorhabditis elegans modificată genetic* , care a devenit albastră ca răspuns la stresul din mediu, cum ar fi

toxinas o calor.

Genetica

24

comportamentală

CONCEPTE CAPITOL

Comportamentul este un răspuns complex la stimuli, mediat atât de gene, cât și de mediu.

►► Metoda analizei comportamentale este utilizată pentru a stabili dacă trăsăturile comportamentale sunt ereditare. Dacă da, se efectuează încrucișări genetice pentru a identifica numărul *și* locația cromozomială a genelor care contribuie la trăsătură.

►► Metoda de analiză genă cu genă utilizează mutageneza pentru a identifica tulpinile purtătoare de mutații ale unei singure gene care contribuie la un răspuns comportamental. Comparațiile ulterioare ale alelelor normale și mutante oferă informații despre mecanismul de bază care controlează răspunsul comportamental.

►► Metodele de analiză comportamentală și bazate pe gene au fost utilizate cu succes pentru a analiza răspunsurile comportamentale la Drosophila , făcând-o un organism model pentru studierea funcției sistemului nervos și a mecanismelor care stau la baza tulburărilor comportamentale umane .

►► Multe tulburări de comportament uman sunt răspunsuri complexe la stimuli. Aceste răspunsuri sunt mediate de gene, factori de mediu și interacțiuni dintre gene și mediu . Tehnicile genomice dezvoltate recent sunt utilizate pentru a studia rolul genelor în comportamentul uman .

w—** 1 este în general definit ca fiind

o reacție la stimuli, interni sau externi, care modifică răspunsul organismului la mediul său.

Animalele aleargă, stau nemișcate sau se luptă

---- Acestea atacă în prezența unui prădător; păsările își construiesc cuiburi complicate și distincte ca răspuns la o combinație de semnale interne și externe; plantele se apleacă spre lumină; iar oamenii se comportă atât în moduri simple, cât și complexe, ghidați de intelectul, emoțiile și cultura lor.

Eforturile de a studia rolul eredității în comportament au început în secolul al XIX-lea cu Francis Galton, care a studiat sistematic comportamentul și ereditatea. Într-unul dintre primele sale studii, și-a examinat propria familie (era văr cu Charles Darwin), încercând să găsească un model de moștenire asociat cu inteligența. Până la începutul secolului al XX-lea, fuseseră identificate cazuri clare de influență genetică asupra comportamentului, dar la acea vreme, comportamentul era de interes în primul rând pentru psihologi, care erau preocupați de comportamentul învățat sau condiționat. Se considera că astfel de comportamente reflectă influența mediului, excluzând genotipul ca și cauză. Diferența dintre aceste două abordări ale studierii comportamentului a fost punctul de plecare a ceea ce a devenit cunoscut sub numele de dezbaterea natură-educație. În această dihotomie simplistă (și falsă), comportamentul era considerat a fi controlat în întregime fie de gene, fie de mediu.

Această controversă a prezentat o viziune distorsionată asupra naturii răspunsurilor comportamentale. La urma urmei, orice comportament trebuie să se bazeze pe exprimarea genotipului unui individ, care își are locul într-o ierarhie de parametri de mediu (adică, exprimarea genelor depinde de interacțiunile din interiorul celulelor , țesuturilor, organelor, organismului și, în cele din urmă, din interiorul populației și al mediului înconjurător). Fără gene și mediile lor, niciun comportament nu ar fi posibil. Cu toate acestea, dezbaterea natură-educație a continuat până în anii 1950. Până atunci, devenise clar că modelele comportamentale rezultau din interacțiunea factorilor genetici și de mediu. Întrucât sistemul nervos simte mediul, procesează informațiile și inițiază răspunsul pe care îl percepem ca și comportament, o mare parte din studiul comportamentului în genetică și biologie moleculară se concentrează pe dezvoltarea, structura și funcția sistemului nervos. Din jurul anului 1950, cercetarea componentelor genetice ale comportamentului s-a intensificat , iar aprecierea importanței geneticii în înțelegerea comportamentului a crescut. Având în vedere această scurtă istorie, iată câteva dintre întrebările de bază la care vom răspunde pe parcursul capitolului .

- Cum definim comportamentul?
- Ce dovezi există că acest comportament are o bază biologică sau genetică?
- Ce studiază genetica comportamentală ?
- Cum controlează sau influențează o genă un anumit comportament?
- Cum interacționează genele cu mediul pentru a produce un răspuns comportamental ?
- Care este calea prin care o genă ajunge la un fenotip comportamental ?

Definiția comportamentului prezentată la începutul acestui capitol , bazată pe schimbările observabile în relația dintre o celulă sau organism și mediul său , ca urmare a anumitor stimuli, este identificată în sens larg cu fenotipul pe care geneticienii îl folosesc ca punct de plecare pentru investigarea bazei biologice a comportamentului . Dovezile că unele comportamente au o bază genetică provin din mai multe surse: comportamente observabile specifice speciei , cum ar fi ritualurile de curtare , și selecția artificială , care utilizează variații specifice în comportamentul organismelor din cadrul populațiilor pentru a obține soiuri care prezintă diferențe comportamentale ereditare . La oameni , studiile pe gemeni și adopție au furnizat dovezi pentru rolul eredității în răspunsurile comportamentale.

În studiul controlului genetic al comportamentului au fost utilizate două abordări diferite pentru a defini interacțiunea dintre factorii genotipici și cei de mediu și pentru a analiza căile de la gene la un fenotip comportamental . O abordare este abordarea de sus în jos , sau comportamentală , în care un comportament specific este identificat într-un organism, iar apoi se utilizează încrucișări genetice pentru a produce tulpini care prezintă fie un nivel ridicat , fie un nivel scăzut al acestui răspuns comportamental . Odată ce aceste tulpini sunt obținute , se efectuează încrucișări suplimentare pentru a identifica și analiza componentele genetice ale - comportamentului . A doua abordare este o abordare de jos în sus , sau bazată pe gene , în care mutageneza urmată de screening este utilizată pentru a identifica mutațiile unei singure gene asociate cu variații comportamentale sau comportamente anormale . Analiza mecanismului molecular al acțiunii genelor în aceste tulpini mutante oferă adesea o explicație directă pentru comportament. Fiecare dintre aceste abordări are avantajele și dezavantajele sale , dar, în ciuda diferențelor lor , ele au aceleași obiective: stabilirea naturii ereditare a unui comportament specific , pentru a identifica și enumera

genele sau sistemele genetice implicate în comportamentul studiat ; atribuirea acestor gene sau sisteme genetice unor cromozomi specifici; și pentru a elucida mecanismele moleculare prin care aceste gene influențează un răspuns comportamental. O a treia abordare, recent dezvoltată pentru studiul geneticii comportamentale, se bazează pe metode care permit analiza genomurilor complete pentru a identifica gene și markeri genetici, precum și variații genomice legate de comportamente specifice.

Opinia predominantă în prezent este că majoritatea comportamentelor sunt trăsături complexe care implică o serie de gene, precum și interacțiuni între aceste gene și între aceste gene și influențele mediului. În acest scenariu, genotipul oferă baza biologică sau capacitatea mentală (sau ambele) necesare pentru a efectua un anumit comportament și, de asemenea, determină limitele influențelor mediului. În acest capitol, vom examina cele trei abordări pentru studierea bazei genetice a comportamentului, vom evalua punctele forte și punctele slabe ale fiecăreia și vom analiza ce am învățat despre comportamentul uman din aceste metode și din utilizarea organismelor model.

24.1

Abordarea analizei comportamentale poate stabili tulpini genetice cu diferențe de comportament

Abordarea *analizei comportamentale* începe cu selecția - organismelor care prezintă un comportament specific dintr- o populație genetic eterogenă. Dacă este posibil să se obțină tulpini genetice care exprimă uniform acel comportament și dacă trăsătura poate fi transferată prin încrucișări genetice la o altă tulpină care inițial nu a prezentat comportamentul studiat, atunci implicarea genetică în comportament este confirmată. Adesea , selecția este utilizată pentru a crea două tulpini: una care prezintă niveluri ridicate și alta care prezintă niveluri scăzute ale comportamentului investigat. Această selecție bidirecțională creează două linii care prezintă diferențe comportamentale din ce în ce mai mari. Dacă comparația genetică a tulpinilor rămâne constantă, această metodă maximizează diferențele dintre genele care controlează trăsătura de interes și poate minimiza diferențele dintre toate celelalte gene. Pentru a ilustra această abordare, vom folosi studiul comportamentului emoțional la șoareci și geotaxia la *Drosophila.*

Cartografierea genelor legate de anxietate la șoareci

Pentru a identifica și cartografia genele care controlează comportamentul emoțional la șoareci, Jonathon Flint și colegii săi au utilizat cartografierea cantitativă a loci-urilor de trăsături (QTL); vezi Capitolul 23 pentru o explicație a QTL-urilor. Într -un experiment , au fost încrucișați indivizi heterozigoți din încrucișările dintre C57BL/6J (o tulpină cu anxietate scăzută , non -emoțională) și BALB/cJ (o tulpină emoțională, cu anxietate ridicată); urmașii au fost selectați pe parcursul mai multor generații pentru extremele cu anxietate ridicată (Hla) și anxietate scăzută (Lia) . Aceste tulpini consangvinizate au fost supuse diferitelor teste de anxietate comportamentală , inclusiv câmpul deschis, labirintul încrucișat elevat (Figura 24.1) și un test cunoscut sub numele de testul cutiei alb - negru . În acest test final, șoarecii au fost plasați într- un mediu care conținea o cutie închisă , întunecată , din care puteau ieși într-o zonă luminată. Animalele tematoare au preferat să rămână în interiorul cutiei și să nu exploreze zonele luminate ale mediului. Cei mai extremi descendenți recuperați din aceste teste de anxietate au fost analizați folosind 84 de markeri microsateliți și patru măsuri diferite ale emoționalității. Un QTL a fost identificat pe cromozomul 1 și localizat într-o mică regiune a cromozomului care se întinde pe 66 Mb. Analiza a peste 1600 de șoareci din populații replicate a dat în mod constant aceleași rezultate. Experimente similare care au folosit markeri microsateliți au arătat că QTL-urile care controlează alte aspecte ale comportamentului sunt distribuite pe toți cromozomii șoarecilor (Figura 24.2).

FIGURA 24.1 Un șoarece explorează un mediu nou din brațul deschis al unui labirint în formă de cruce , un dispozitiv standard pentru măsurarea fricii la șoareci . Acest experiment a făcut parte dintr-o serie concepută pentru a identifica genele implicate în frică și anxietate la șoareci.

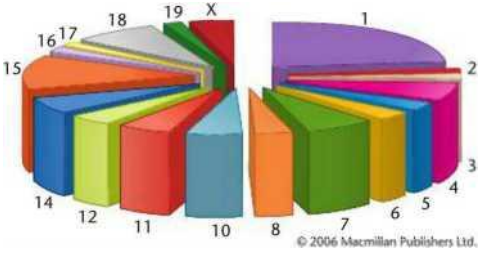


FIGURA 24.2 Locii genelor care controlează frica și alte forme de comportament emoțional sunt distribuiți pe 17 din cei 19 autozomi ai genomului șoarecelui. Un număr semnificativ dintre aceste gene sunt localizate pe cromozomii 1, 15 și 18.

Dincolo de cartografierea unei regiuni QTL, care poate conține zeci de gene, și identificarea loci-urilor specifice implicate în comportamentul emoțional necesită utilizarea combinată a geneticii și genomicii . Genele din regiunea QTL a cromozomului 1 care au fost identificate ca fiind legate de un fenotip comportamental sunt testate în teste de complementare genică pentru a detecta interacțiunile dintre aceste loci. Secvențierea ADN-ului acestor regiuni este utilizată pentru a identifica și clona aceste gene. Odată identificate, va trebui determinate mecanismele de acțiune ale acestor loci comportamentale și relevanța lor pentru comportamentul uman.

Selecția geotaxiei la *Drosophila*

O taximetrie este o mișcare către sau departe de un stimul extern. Răspunsul poate fi pozitiv (mișcare spre stimul) sau negativ (mișcare departe de stimul). Multe tipuri de stimuli provoacă acest comportament, inclusiv substanțele chimice (chemotaxie), gravitația (geotaxie) și lumina (fototaxie).

Pentru a investiga geotaxia la *Drosophila,* Jerry Hirsch și colegii săi au proiectat un labirint pentru a testa aproximativ 200 de muște per încercare, așa cum se arată în Figura 24.3. Odată ajunși în labirint, muștele aleg în mod repetat între a se deplasa în sus sau în jos. Muștele care se mișcă în sus la fiecare intersecție sunt colectate în tuburile din partea superioară a labirintului; cele care aleg întotdeauna să se miște în jos sunt colectate în tuburile inferioare; iar cele care uneori merg „în sus" și alteori „în jos" ajung într-un tub intermediar. Muștele pot fi selectate atât pentru geotaxie, cât și pentru alte moduri de mișcare.

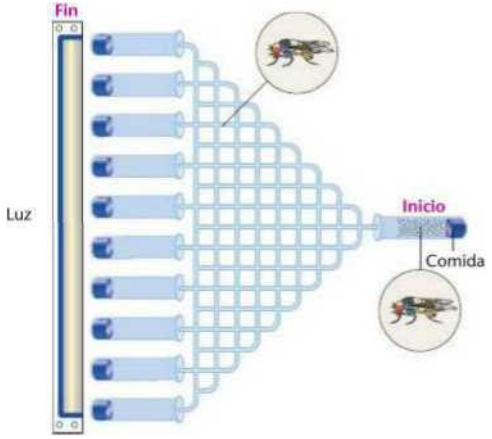


FIGURA 24.3 Diagrama unui labirint utilizat pentru studierea geotaxiei la *Drosophila*.

mișcarea ascendentă prin labirint), precum și negativ (mișcarea descendentă prin labirint), stabilind existența unei influențe genetice asupra acestui răspuns comportamental. După cum se arată în Figura 24.4, scorurile medii ale muștelor din labirint au variat de la aproximativ +4 la -6, indicând faptul că selecția este mai puternică pentru geotaxia negativă decât pentru geotaxia pozitivă.

Cele două linii au fost selectate timp de aproape 40 de ani, ceea ce implică aproximativ 1000 de generații, iar

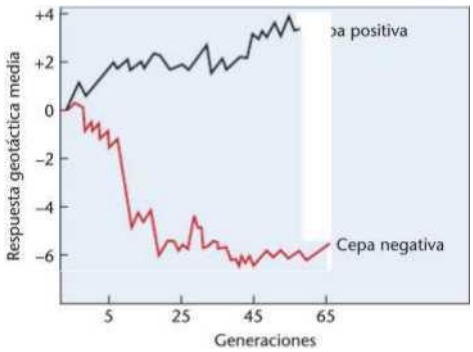


FIGURA 24.4 Selecția geotaxiei pozitive și negative la *Drosophila* pe parcursul mai multor generații. Valorile reprezintă suma mișcărilor ascendente (+) *sau descendente (* —) prin labirint.

Testele au fost efectuate pe peste 80.000 de musculițe. Prin - experimente, s-au observat diferențe clare, deși fluctuante. Aceste rezultate indică faptul că acest comportament complex la *Drosophila* este controlat genetic și este o trăsătură poligenică. Folosind linii selectate pentru geotaxie pozitivă și negativă, Hirsch și colegii săi au analizat contribuția relativă a genelor de pe diferiți cromozomi la acest comportament. Efectele cromozomilor X, 2 și 3 asupra geotaxiei au fost identificate într-un mod ingenios. Figura 24.5 arată cum s-a realizat acest lucru. Un mascul dintr-una dintre linii a fost încrucișat cu o femelă „test",

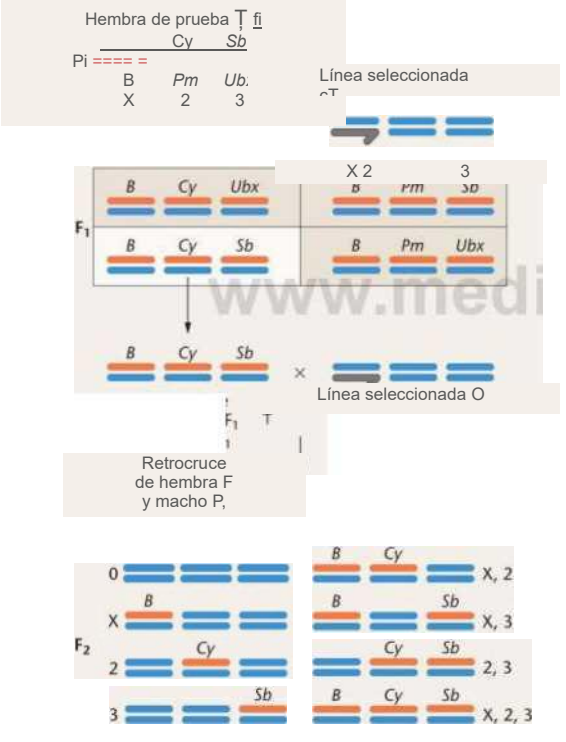


FIGURA 24.5 În această schemă de împerechere la Drosophila , este posibil să se evalueze efectul genelor situate pe cromozomi specifici care contribuie la geotaxie. Descendenții produși prin retroîncrucișare de la femelă conțin toate combinațiile posibile de cromozomi . Prin examinarea prezenței sau absenței fenotipurilor marker dominante la aceste musculițe, este posibil să se determine ce cromozomi ai tulpinii selectate sunt prezenți. Apoi se efectuează teste pentru geotaxie . (B = *ochi bar; Cy = aripi curbate; Sb = ghimpi; Pm = ochi pruni; Ubx = ultrabithorax) Denumirile de lângă fiecare* genotip al generației $_{F2}$ (de exemplu, X, 2 și 3) indică ce cromozomi sunt heterozigoți. Fiecare dintre acești cromozomi a fost marcat cu o mutație dominantă (acești cromozomi sunt numiți cromozomi de echilibrare). Fiecare cromozom de echilibrare poartă una sau mai multe inversiuni pentru a suprima recuperarea produselor de încrucișare . O femelă F1 va fi heterozigotă pentru fiecare cromozom și este retroîncrucișată cu un mascul $_{din}$ linia originală. În generația F2 , urmașii femele conțin toate combinațiile cromozomilor marker și cromozomii tulpinii selectate. Mutațiile dominante purtate de cromozomii dominanți fac posibilă identificarea cromozomilor din liniile selectate care sunt prezenți în configurații homozigote sau heterozigote. Muștele cu genotipurile 0 și X (Figura 24.5) sunt homozigote și heterozigote, respectiv , pentru cromozomul X al tulpinii selectate. În mod similar , muștele cu genotipurile 0 și 2 sunt homozigote și heterozigote, respectiv , pentru cromozomul 2 al tulpinii selectate , iar muștele cu genotipurile 0 și 3 sunt homozigote și heterozigote , respectiv, pentru cromozomul 3 al tulpinii selectate . Prin efectuarea de teste cu mușt e care poartă toate aceste combinații cromozomiale în labirint , este posibil să se evalueze influența genelor de pe orice cromozom dat asupra comportamentului. În cazul muștelor geotaxial negative (cele care se mișcă în sus prin labirint) , genele de pe cromozomul 2 contribuie cel mai mult la fenotip , urmate de loci - urile de pe cromozomul 3 și cromozomul X (un gradient de efecte - cromozomiale 2 > 3 > X) . Pentru linia pozitivă (mușt e care se mișcă în jos prin labirint), există un gradient invers (X > 3 > 2) .

Luate împreună, rezultatele indică faptul că geotaxia este sub control poligenic și că loci-urile care controlează această trăsătură sunt distribuite pe cei trei cromozomi principali ai *Drosophilei.* Teste genetice suplimentare au fost utilizate pentru a estima numărul de gene care controlează geotaxia la Drosophila . Acest studiu indică faptul că un număr mic de gene, poate doar două până la patru loci, sunt responsabile pentru cea mai mare parte a răspunsului geotaxic la *Drosophila.* Această lucrare este la fel de ingenioasă pe cât este de dificilă și ilustrează, de asemenea, una dintre limitele abordării comportamentale a analizei . Deși selecția geotaxiei a arătat că acest comportament este controlat genetic și că sunt implicați loci de pe toți cromozomii majori , este foarte dificil să se utilizeze această metodă pentru a identifica gene specifice implicate în acest comportament. Acest lucru se datorează parțial faptului că comportamentul este controlat poligenic , iar multe dintre aceste gene pot aduce doar o contribuție mică la fenotip .

Tehnologia genomică , inclusiv analiza cipurilor ADN (descrisă în capitolele 21 și 22), oferă o

modalitate de a identifica gene specifice care influențează trăsături poligenice complexe, inclusiv comportamentul. Cipurile ADN sunt un exemplu de metode experimentale de mare randament care revoluționează genetica și biologia moleculară. În loc să măsoare modificările expresiei unei gene pe rând, microcipurile fac posibilă măsurarea a sute sau mii de gene într-un singur experiment. Genele care urmează să fie utilizate într-o analiză a cipurilor ADN pot fi selectate pe baza modelelor lor de expresie în țesuturi sau celule specifice sau în scenări ale întregului genom.

Pentru a studia geotaxia la *Drosophila,* cercetătorii au folosit un proces în doi pași. În primul rând, cipuri de ADNc, conținând aproximativ o treime din genele din *genomul Drosophila, au fost utilizate* pentru a analiza nivelurile de ARNm în tulpinile cu cel mai ridicat *(Hi5)* și cel mai scăzut (Lo) comportament geotactic. Un număr mic de gene au prezentat diferențe reproductibile în expresie și au fost selectate pentru analize ulterioare. Pentru a restrânge lista genelor candidate, cercetătorii au folosit alele mutante ale acelor gene care au fost asociate cu defecte neurologice. Pentru a doua etapă a acestei strategii de identificare a genelor, analiza comportamentului geotactic, au fost selectate zece linii, inclusiv mai multe linii de control. Comportamentul geotactic și nivelurile de ARNm a trei gene la mușchii mutante au arătat o corelație între nivelurile de expresie ale...

ACUM REZOLVĂ ASTA

24.1 Anumite tulpini de șoareci consangvinizate (de exemplu , C57BL și C3H/2) par să prezinte o preferință pentru alcool în experimentele de consum de alcool prin selecție liberă , iar o serie de tehnici au fost aplicate pentru a evalua predispoziția genetică subiacentă. Probabil, aceste tulpini diferă de altele prin unele alele pe care le au în loci specifici. Cum poate analiza acestor tulpini consangvinizate să ofere informații despre mecanismele moleculare care determină acest comportament ? Tarantino și colegii săi (1998) au aplicat analiza QTL preferinței pentru alcool la șoareci folosind markeri microsateliți. Aceștia au găsit trei QTL semnificative pe cromozomii 1 , 4 și 9 și trei posibile QTL pe cromozomii 2, 3 și 10. Cum poate analiza QTL să conducă la o înțelegere a preferinței pentru alcool la șoareci? Rezumați punctele forte și punctele slabe ale fiecărei abordări.

- SUGESTIE: *Această problemă implică înțelegerea informațiilor care pot fi obținute prin studierea comportamentelor specifice ale unei tulpini și cunoașterea a ceea ce sunt QTL-urile. Cheia rezolvării acesteia depinde de cunoașterea modului în care QTL-urile sunt cartografiate folosind markeri cromozomiali specifici .*

mușchilor *Hi5* și Lo . Individual , fiecare dintre aceste gene aduce contribuții mici, incrementale , la geotaxie, așa cum este de așteptat de la o trăsătură controlată poligenic. Mecanismul prin care aceste trei gene, *criptocromul (cry), pendidina (Pen)* Rolul celor trei gene implicate în geotaxie , inclusiv *factorul de dispersare a pigmentului (Pdf),* este necunoscut. Cu toate acestea, toate trei sunt implicate în dezvoltarea și funcționarea creierului și a sistemului nervos , iar rolul lor în geotaxie este în prezent investigat . Încă nu este clar dacă acestea sunt genele principale implicate sau ținte în aval ale altor gene neidentificate . Cu toate acestea, utilizarea acestei strategii în doi pași este importantă deoarece ilustrează succesul integrării geneticii clasice cu genomica pentru a identifica genele implicate într-o trăsătură poligenică.

24.2

Abordarea analizei genă cu genă examinează alelele mutante pentru a studia mecanismele care stau la baza comportamentului

Deși am explicat geotaxia la *Drosophila* ca exemplu de abordare comportamentală, multe informații au fost obținute și folosind acest organism în studii comportamentale cu abordarea bazată pe gene . Deși *Drosophila* și oamenii s-au separat de un strămoș comun cu milioane de ani în urmă, există aspecte moleculare ale funcției celulare în sistemul nervos care se suprapun considerabil la aceste două organisme. Drept urmare, lucrul cu tulpini mutante de *Drosophila* a oferit perspective asupra mecanismelor fundamentale care guvernează transmiterea impulsurilor nervoase. Așa cum sugerează și numele, abordarea bazată pe gene pentru studierea comportamentului izolează mai întâi tulpinile mutante cu comportament anormal și apoi investighează anomaliile structurale și/sau funcționale care stau la baza acestui comportament modificat.

genă -cu-genă are mai multe avantaje față de abordarea comportament-cu-comportament. Utilizarea acestei abordări permite cercetătorilor să cuantifice impactul unor gene individuale asupra unui răspuns comportamental complex. Utilizarea acestei metode trebuie să ia în considerare natura poligenică a comportamentului și interacțiunea dintre genele contributive. În acest context, abordarea genă-cu-genă poate fi, în teorie, utilizată pentru a identifica, cartografia, clona și secvența toate genele care contribuie la un comportament. Această abordare este simplificată la *Drosophila* deoarece cercetătorii au dezvoltat ...

un set extins și sofisticat de instrumente genetice , în special cromozomi marker și colecții de tulpini cu regiuni cromozomiale șterse și duplicate, precum și mutanți cu markeri citologici pentru analiza mozaicismului.

În secțiunile următoare, vom vedea cum este utilizată analiza mutanților pentru a elucida mecanismele impulsurilor nervoase și aplicarea directă a acesteia la bolile umane, iar apoi vom discuta o formă de comportament complex, învățarea, pentru a ilustra modul în care *Drosophila servește drept organism model* pentru studierea aspectelor moleculare ale comportamentului.

Genele implicate în transmiterea impulsurilor nervoase

Figura 24.6 prezintă un neuron (celulă nervoasă) în care impulsurile sunt generate la un capăt (o dendrită) și călătoresc de-a lungul celulei până la celălalt capăt (axonul), care transmite impulsul neuronilor adiacenți . În timpul acestui proces, impulsul se propagă prin transportul ionilor de sodiu și potasiu prin membrana plasmatică a neuronului . Mișcarea acestor ioni încărcați poate fi monitorizată prin măsurarea modificărilor potențialului electric al membranei.

Pentru a determina genele care controlează generarea și transmiterea impulsurilor nervoase, Barry Ganetzky și colegii săi au monitorizat mutanți comportamentali ai *speciei Drosophila* pentru a identifica anomalii electrofiziologice în generarea și propagarea impulsurilor nervoase . Au fost izolate două clase generale de astfel de mutanți: cei cu defecte în mișcarea sodiului și cei cu defecte în transportul potasiului (Tabelul 24.1). Unul dintre mutanții identificați în timpul acestei proceduri este o alelă sensibilă la temperatură a genei paralitice . Mușteleomozigote pentru această alelă mutantă

TABLA 24.1 ■ Mutaciones de comportamiento de ***Drosophila*** en las que se ve afectada la transmisión de los impulsos nerviosos.

Mutación	Localización en el mapa	Canal iónico afectado	Fenotipo
nap^{rl}	2-56,2	Sodio	Adultos y larvas paralizados a 37,5 °C; reversible a 25 °C
para^{1,}	1-53,9	Sodio	Adultos paralizados a 29 °C, larvas a 37 °C; reversible a 25 °C
Tip-E	3-13,5	Sodio	Adultos y larvas paralizados a 39-40 °C; reversible a 25 °C
se?	2-10,6	Sodio	Adultos paralizados a 38 °C, larvas no afectadas; los adultos se recuperan a 25 °C
Sh	1-57,7	Potasio	Temblor anormal en patas en adultos expuestos a éter
eag	1-50,0	Potasio	Temblor anormal en patas en adultos expuestos a éter
Hk	1-30,0	Potasio	Temblor en patas inducido por éter
sio	3-85,0	Potasio	A 22 °C, los adultos vuelan con poca fuerza; a 38 °C, los adultos se debilitan y descoordinan

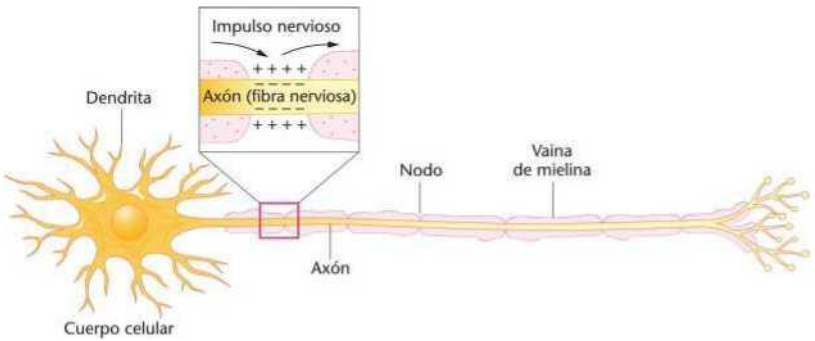


FIGURA 24.6 Una célula nerviosa (neurona) tiene extensiones denominadas dendritas que transportan impulsos hacia el cuerpo de la célula; también tiene uno o más axones que envían los impulsos a lugares alejados del cuerpo de la célula. El axón está envuelto en una vaina de mielina, excepto en los nodos espaciados a intervalos a lo largo del axón. Los impulsos nerviosos son acelerados saltando de nodo en nodo. Electrodos colocados en cualquier lado de la membrana plasmática de la neurona pueden registrar el potencial eléctrico a través de la membrana. Cuando la neurona se encuentra en reposo, hay más sodio fuera de la célula y más potasio en su interior. Cuando se genera un impulso nervioso, el sodio entra en la célula y el potasio sale de la misma, variando el potencial eléctrico. A medida que el impulso se aleja, los iones son bombeados a través de la membrana para restaurar el potencial eléctrico original.

ACUM REZOLVĂ ASTA

24.2 Să presupunem că ați descoperit o muscă de fructe care șchiopătează și își pierde continuu echilibrul atunci când se mișcă. Descrieți cum ați determina dacă acest comportament se datorează unei leziuni (induse de mediu) sau unei trăsături moștenite. Presupunând că este o trăsătură moștenită, care sunt diferitele moduri în care o genă poate determina exprimarea acestei trăsături? Descrieți cum ați determina experimental mecanismul de exprimare a genelor dacă gena ar fi legată de cromozomul X.

- **SUGESTIE: Această** *problemă implică înțelegerea modului în care trăsăturile sunt moștenite și transmise urmașilor în încrucișările mendeliene și rezultatele așteptate ale încrucișărilor care implică gene recesive, dominante și legate de cromozomul X. Cheia rezolvării acesteia este să determinați mai întâi dacă veți utiliza în analiza dumneavoastră metoda de analiză comportamentală sau bazată pe gene.*

Acestea devin paralizate atunci când sunt expuse la o temperatură de 29 °C sau mai mare, dar își revin rapid când temperatura scade la 25 °C. Studiile electrofiziologice au demonstrat că mușchii mutante prezintă un transport defect al sodiului asociat cu conducerea impulsurilor nervoase.

Ulterior, Ganetzky și colegii săi au cartografiat, izolat și clonat *gena paralitică.* Acest locus codifică o proteină a canalului de sodiu, care controlează mișcarea sodiului prin membrana celulelor nervoase în multe organisme diferite, de la muște la oameni. Aceiași cercetători au descoperit că o altă alelă mutantă, numită *Shaker* (izolată acum aproximativ 40 de ani ca mutant comportamental), codifică o proteină a canalului de potasiu. Această genă a fost, de asemenea, clonată și caracterizată. Deoarece mecanismul conducerii impulsului nervos a fost deosebit de conservat de-a lungul evoluției animale, genele clonate *ale Drosophilei* au fost utilizate ca sonde pentru a izola genele echivalente ale canalelor ionice umane. Studierea genelor umane oferă noi perspective asupra bazei moleculare a activității neuronale. Gena canalului de sodiu este defectă într-o formă ereditară de aritmie cardiacă. Identificarea și clonarea genei umane face acum posibilă urmărirea membrilor familiei cu risc pentru această tulburare potențial fatală.

Drosophila poate învăța și memora

Cercetătorii pot beneficia enorm de pe urma studierii geneticii comportamentelor complexe, cum ar fi învățarea, la un organism model la fel de ușor de manipulat precum *Drosophila.* Totuși, acest lucru este posibil numai dacă organismul model poate prezenta comportamentul complex pe care cercetătorii sunt interesați să îl studieze . Prin urmare, înainte de a utiliza *Drosophila* pentru a studia învățarea, cercetătorii trebuiau să știe dacă *Drosophila* poate învăța. Laboratorul lui Seymour Benzer a fost unul dintre *primele* care a identificat gene care controlează învățarea și memoria la *Drosophila. Pentru a face acest lucru,* echipa lui Benzer a folosit un sistem de învățare bazat pe olfactie în care mușchilor li s-au prezentat două mirosuri , dintre care unul a fost asociat cu un șoc electric. Mușchii au învățat rapid să evite mirosul asociat cu șocul. Din mai multe motive, se crede că acest răspuns este învățat. În primul rând, comportamentul se bazează pe un stimul sau un răspuns cu o oarecare întărire. În al doilea rând, răspunsul este reversibil: mușchii pot fi antrenate să selecteze un miros pe care l- au evitat anterior . În al treilea rând, mușchii prezintă memorie pe termen scurt pentru ceea ce au învățat.

Demonstrația faptului că *Drosophila* poate învăța a deschis calea pentru selecția mutanților cu defecte de învățare și memorie (Tabelul 24.2). Pentru a realiza acest lucru, masculii dintr-o tulpină sălbatică consangvinizată au fost tratați cu mutageni și împerecheați cu femele din aceeași tulpină. Descendenții lor au fost recuperați și încrucișați pentru a produce tulpini care purtau un cromozom X mutagenizat. Mutațiile care afectează învățarea au fost selectate prin testarea răspunsului la un dispozitiv care emitea șocuri bazate pe miros. În acest fel, au fost izolați mutanții cu deficiențe de învățare, inclusiv mutanții de *nap, nap natin, rutabaga* și *varză. În plus,* a fost obținut un mutant cu deficit de memorie, *amnezia,* care învață normal, dar uită ceea ce a învățat de patru ori mai repede decât în mod normal. Fiecare dintre aceste mutații reprezintă o singură genă defectă ce afectează o formă specifică de comportament. Având în vedere metoda utilizată pentru detectarea lor, toți mutanții găsiți până acum sunt gene legate de X. Folosind alte metode, au fost identificate alte gene autozomale care controlează învățarea și memoria .

Disecția mecanismelor neuronale și a căilor de învățare

Screening-ul mușchilor *Drosophila* cu defecte de învățare și memorie a avut succes, permițând identificarea mai multor gene implicate în aceste comportamente. Unele dintre aceste mutații au acționat în diferite etape ale aceleiași căi biochimice, ducând la identificarea mecanismelor și căilor neuronale implicate în învățare și memorie. De exemplu, un grup de mutații legate de învățarea *la Drosophila* provoacă o defecțiune într -un sistem de

TABLA 24.2

Unele mutații la ***Drosophila*** care afectează învățarea și memoria.

	Función molecular	Fenotip comportamental, funcție
prostuț (dnc)	Fosfodiesterasa específica del cAMP	*calciu/calmodulină (CaMKII) Neurofibromatoză 1 (Nfl)*
rutabaga (rut)	Adenilil ciclasa	Sistem musculo-scheletic, toleranță la etanol, învățare a curtării , toleranță la etanol , îngrijire
	Neuropéptido	Toleranța la etanol
amnezic (amn); ieftin (chpd)	Factor de replicación del ADN Canal de potasio sensible al potencial	Hrănirea larvelor
latheo (lat.)		Suprimarea curtării, gestație defectuoasă, sensibilitate la eter
Shaker (Sh)	Proteína G heterotrimérica	Comportament vizual, sensibilitate la cocaină
Proteine G 60 A	Proteína serina/treonina quinasa	Sistemul musculo-scheletic, toleranța la etanol
DCO; protein kinaza I dependentă de cAMP (Pka-C1)	Factor de transcripción	Sistemul locomotor *(CrebB17A); dCREB*
Proteina B de legare a elementului de răspuns la cAMP la 17A Proteina kinaza II de	Proteína serina/treonina quinasa Activador Ras GTPasa	Suprimarea curtării Defecte ale sistemului nervos embrionar

Sursa: **Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd:** ***Nature Reviews Genetics*****, „Drosophila: Genetics Meets Behavior", de MB Sokolowski.** ***Nature Reviews Genetics*** **2:879-890, tabelul 1, p. 882. Drepturi de autor 2001, www.nature.com/nrg .**

Transducția semnalului joacă un rol important în procesul de învățare.

În celulele sistemului nervos și în multe alte tipuri de celule , adenozin monofosfatul ciclic (AMPc) este produs în citoplasmă din adenozin trifosfat (ATP) ca răspuns la semnalele primite la suprafața celulei *(vezi* Figura 24.7). Odată produs, AMPc activează protein kinazele, care la rândul lor fosforilează proteinele, transferă semnalul la nucleu și inițiază o cascadă de modificări în expresia genelor.

Mutanții comportamentali ai *speciei Drosophila* au fost printre primele organisme care au permis oamenilor de știință să verifice relația dintre metabolismul AMPc și învățare. *Locusul rutabaga (rut)* codifică adenilil ciclaza, enzima care sintetizează AMPc din ATP. Într -o alelă mutantă a *rutabaga,* o mutație nonsens distruge activitatea catalitică a adenilil ciclazei, ducând la tulburări de învățare la muștele homozigote. *Locusul dunce (dnc)* codifică gena structurală pentru enzima AMPc fosfodiesterază, care degradează adenilil ciclaza. Alelele mutante ale *genei dunce duc, de asemenea, la* tulburări de învățare . Mutația napului (*tur)* apare într-o genă care codifică o proteină G, o clasă de molecule care se leagă de guanozin trifosfat (GTP) și, la rândul lor, activează adenilil ciclaza. Analiza acestor mutații a identificat, de asemenea, părți ale sistemului nervos unde sunt procesate informațiile senzoriale și unde se formează memoria pe termen lung și scurt .

Celulele din creierul *Drosophilei, numite* neuroni *corpora pedunculata* (Figura 24.8) integrează și procesează inputul senzorial de la stimulii olfactivi și descărcările electrice. Când ambii stimuli ajung simultan la *corpora pedunculata,* aceștia stimulează adenilil ciclaza și activează un receptor cuplat cu proteina G, crescând nivelurile de cAMP. Creșterea cAMP produce modificări ale excitabilității neuronilor din corpora *pedunculata.* Nivelurile ridicate de cAMP suprareglează expresia unei protein kinaze, ceea ce îmbunătățește atât memoria pe termen scurt, cât și pe termen lung . Memoria pe termen scurt este mediată de modificări ale canalelor de

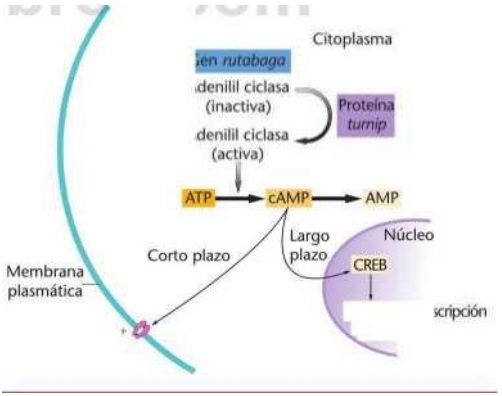


FIGURA 24.7 Calea de sinteză și degradare a AMP ciclic (AMPc). ATP-ul este convertit în AMPc de către enzima adenilil ciclază; AMPc afectează memoria pe termen scurt prin canalul de potasiu al membranei plasmatice și memoria pe termen lung prin reglarea factorului de transcripție CREB. La *Drosophila,* gena *rutabaga* codifică adenilil ciclaza. Când este produsă, enzima este inactivă; această enzimă este convertită în forma sa activă de către o proteină codificată de *gena napului. O proteină codificată de* gena *baciului* inactivează enzima. Mutațiile din oricare dintre aceste gene afectează învățarea și memoria la *Drosophila.*

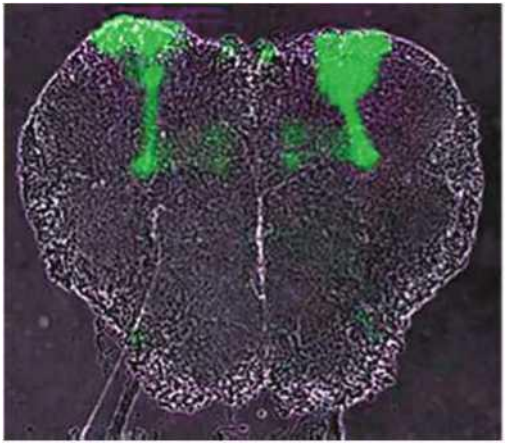


FIGURA 24.8 Proteina fluorescentă verde (GFP) marchează neuronii din *corpora peduncolata* ai *creierului la Drosophila*. Celulele din această regiune sunt importante pentru învățare și memorie.

Potasiu. Memoria pe termen lung este asociată cu modificări ale expresiei genelor din neuronii corpora *pedunculata,* care este controlată de un activator transcripțional, CREB (proteina de legare a elementului de răspuns la cAMP). CREB se leagă de elementele din amonte de genele inductibile de cAMP și modifică modelul de expresie genică, codificând astfel memoria.

Căile biochimice care controlează învățarea și memoria la *Drosophila* sunt similare cu cele din alte organisme , inclusiv șoareci și oameni. Omologii genelor *Drosophila la mamifere* sunt activi în părți ale creierului șoarecilor implicate în învățare și memorie. În prezent, se utilizează noi metode de screening genetic la șoareci și muște pentru a identifica noi gene și alte căi biochimice implicate în învățare.

24.3

Comportamentul uman are componente genetice

Controlul genetic al comportamentului s-a dovedit a fi mai dificil de caracterizat la oameni decât la alte organisme, parțial pentru că tipurile de răspunsuri considerate cele mai interesante forme de comportament uman, cum ar fi inteligența, limbajul, personalitatea și emoțiile , sunt *dificil* de *studiat* . *Două probleme* apar în studiul acestor comportamente . În primul rând, este complicat să se definească obiectiv și să se măsoare cantitativ aceste trăsături. În al doilea rând, ele sunt afectate de factorii de mediu și există o gamă largă de variații individuale în răspunsurile la acești factori. În fiecare caz, mediul este extrem de important în modelarea, limitarea sau favorizarea fenotipului final.

Din punct de vedere istoric, au existat și alte motive care au împiedicat studiul geneticii comportamentului uman. Multe dintre primele studii asupra comportamentului uman au fost realizate de psihologi cu pregătire limitată în genetică. În al doilea rând, trăsăturile care implică inteligența, personalitatea și emoțiile au o mare semnificație socială și politică. Prin urmare, rezultatele cercetărilor asupra acestor trăsături tind să fie senzaționalizate și distorsionate atunci când sunt raportate publicului. De fapt, întrucât studiul acestor trăsături se apropie adesea de încălcarea libertăților individuale, cum ar fi dreptul la viață privată, studiile în sine și cu atât mai mult concluziile lor provoacă frecvent controverse.

Deplângând discrepanța dintre psihologie și genetică în studiul comportamentului uman, C.C. Darlington scria în 1963: „Comportamentul uman a devenit un paradis pentru iubitorii de literatură, iar motivul este că psihologia și genetica, al cărei scop este de a explica comportamentul, nu au reușit să abordeze această sarcină împreună.” Din 1963, s-au înregistrat unele progrese în reducerea acestui decalaj, dar genetica comportamentului uman continuă să provoace controverse.

Aici vom lua în considerare trei metode de studiere a geneticii comportamentului uman: analiza genelor izolate cu componente comportamentale, utilizarea modelelor animale și metodele genomice. Ca și alte domenii ale geneticii comportamentale, studiul comportamentului uman se bazează atât pe analiza genelor izolate, cât și pe investigarea trăsăturilor multigenice complexe cu componente de mediu.

Gene izolate și comportament: boala Huntington

Bolile neurodegenerative afectează milioane de oameni în Statele Unite și în întreaga lume. Aceste boli sunt asociate cu acumularea progresivă de proteine pliate greșit în spațiile intracelulare și extracelulare, ducând la moartea celulelor creierului. Unele dintre aceste boli, cum ar fi boala Alzheimer (BA) familială, boala Parkinson , scleroza laterală amiotrofică (SLA) și boala Huntington (BH), pot fi cauzate de mutații într-o singură genă.

Boala Huntington este o afecțiune moștenită autosomal dominantă care afectează aproximativ 1 din 10.000 de persoane, provocând moartea anumitor celule cerebrale. Simptomele apar de obicei în jurul vârstei de 50 de ani, cum ar fi pierderea treptată a funcției motorii și a coordonării. Pe măsură ce degenerarea structurală a creierului progresează, apar schimbări de personalitate. Simptomele sunt cauzate de moartea celulelor cerebrale în anumite regiuni ale creierului, inclusiv cortexul cerebral și striatumul. Majoritatea persoanelor cu boala Huntington mor la 10 până la 15 ani de la debutul bolii.

Simptomele bolii Huntington apar de obicei între vârstele de 35 și 45 de ani, în general după nașterea unor copii, care vor trebui să trăiască știind că au o șansă de 50% de a dezvolta boala (persoanele afectate sunt de obicei heterozigote). Gena Huntington, situată pe cromozomul 4, a fost una dintre primele gene localizate folosind analiza RFLP (polimorfism al lungimii fragmentului de restricție). Gena codifică o proteină lungă (350 kDa) numită huntingtină (Htt), care este esențială pentru supraviețuirea anumitor neuroni din creierul adult. Alelele mutante Huntington au un număr extins de repetiții trinucleotidice citozină-adenină-guanină (CAG) în exonul 1 (vezi Capitolul 15 pentru o discuție despre repetițiile trinucleotidice). Alelele normale ale genei Huntington au între 7 și 34 de repetiții CAG, care specifică inserarea mai multor copii ale aminoacidului glutamină în apropierea capătului amino al proteinei huntingtină. În alelele mutante, extinderea repetițiilor CAG plasează reziduuri suplimentare de glutamină în proteina codificată. Adăugarea a peste 40 de repetiții CAG și reziduurile suplimentare de glutamină determină ca Htt să devină toxic și să ducă la moartea celulară în anumite regiuni ale creierului, rezultând anomalii comportamentale.

Au fost dezvoltate modele animale transgenice pentru boli neurodegenerative cauzate de mutații monogenice, inclusiv boala Alzheimer, SLA și boala Huntington. Aceste modele au fost utilizate pentru a studia evenimentele moleculare de sinteză, procesare și agregare a proteinelor mutante, precum și relațiile dintre acumularea de proteine, moartea celulară și modificările comportamentale.

Un model transgenic de șoarece pentru boala Huntington

Mai multe modele animale de Boala Huntington au fost dezvoltate pentru a studia funcția normală a huntingtinei, a modela procesul bolii, a studia efectele acesteia la nivel molecular și a dezvolta medicamente care încetinesc sau opresc degenerarea și moartea celulelor creierului. Pentru a studia relația dintre lungimea repetiției CAG și progresia bolii , Danilo Tagle și colegii săi au creat șoareci transgenici cu o genă *Boala Huntington* . Om cu 16, 48 sau 89 de copii ale repetiției CAG . În vectorul utilizat pentru transferul de gene, gena *HD* a fost plasată lângă un promotor și un amplificator pentru a asigura niveluri ridicate de expresie (vezi Capitolul 22 pentru o discuție despre organismele transgenice). Șoarecii purtători ai transgenei au fost monitorizați de la naștere până la moarte pentru a determina vârsta de debut și progresia fenotipurilor comportamentale anormale . Șoareci cu gene *HD* Cu 48 sau 89 de repetiții, aceștia au prezentat anomalii comportamentale la 8 săptămâni, iar la aproximativ 20 de săptămâni, acești șoareci au prezentat atât coordonare motorie , cât și anomalii comportamentale în comparație cu animalele de control și șoarecii purtători de gene *HD umane* cu 16 repetiții CAG.

șoarecilor de tip sălbatic și al animalelor transgenice purtătoare de alele mutante cu 16, 48 și 89 de copii ale repetiției CAG a fost examinat la diferite vârste pentru a detecta modificări de structură . Degenerarea neuronală și pierderea celulară au fost evidente la șoarecii cu 48 și 89 de repetiții , dar nu s-au observat modificări în creierul șoarecilor de tip sălbatic sau al celor purtători ai genei cu 16 repetiții (Figura 24.9) .

Modificările comportamentale și degenerarea anumitor regiuni ale creierului la șoarecii transgenici sunt similare cu progresia bolii Huntington la om . Acești șoareci sunt utilizați acum pentru a studia modificările timpurii ale structurii creierului care apar înainte de apariția simptomelor inițiale și pentru a dezvolta tratamente experimentale care încetinesc sau inversează pierderea celulară . Cu un model murin al acestei boli, cercetătorii pot administra tratamente în stadii specifice și pot evalua rezultatele tratamentului înainte de apariția simptomelor bolii Huntington.

Mecanismele bolii Huntington

Deși gena *HD* a fost cartografiată, izolată și caracterizată acum aproximativ 25 de ani , mecanismul prin care formele mutante ale proteinei Htt (mHtt) cauzează boala Huntington este încă necunoscut. Htt este exprimat în toate celulele corpului, cu niveluri mai ridicate în creier și testicule . Forma mutantă a Htt provoacă inițial moartea celulelor striatale din creier. Au fost propuse mai multe mecanisme pentru a explica modelul de

...

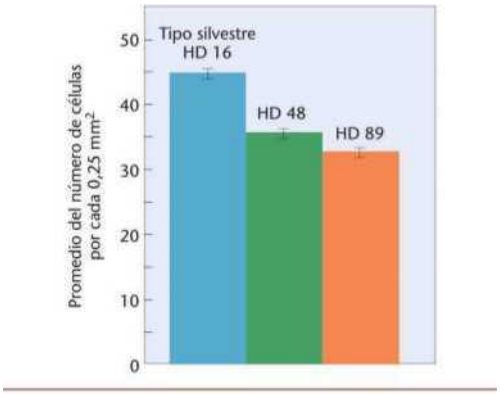


FIGURA 24.9 Niveles relativos de pérdida neuronal en ratones

Șoareci transgenici HD. Numărul de celule arată o reducere semnificativă a anumitor neuroni (neuroni de dimensiuni mici spre medii) în striatul creierului mutanților HD 48 (coloana centrală) și mutanților HD 89 (coloana din dreapta), comparativ cu șoarecii de tip sălbatic (coloana din stânga). Pierderea celulară în acest țesut cerebral a fost constatată și la persoanele cu boala Huntington, ceea ce face ca acești șoareci transgenici să fie modele valoroase pentru studierea progresiei acestei boli.

moartea celulară specifică regiunii , inclusiv metabolism mitocondrial anormal, activitate crescută a proteazelor asociate cu moartea celulară (apoptoză), pliere greșită a Htt și formarea de inserții nucleare care conțin fragmente de Htt .

Descoperirea recentă a faptului că mHtt se leagă de Rhes, o proteină mică situată în celulele din regiunea striată a creierului, ar putea explica natura specifică celulelor a toxicității proteinei . Experimentele arată că atunci când mHtt se leagă de Rhes , acesta este modificat chimic într-o formă care induce moartea celulară. Niveluri scăzute de Rhes sunt prezente și în cortexul cerebral , o altă regiune a creierului unde Htt provoacă moartea celulară. Această descoperire sugerează că dezvoltarea de medicamente care blochează interacțiunea mHtt cu Rhes ar putea fi valoroasă pentru tratarea bolii Huntington . Cu toate acestea, așa cum vom discuta mai târziu, Htt este o proteină multifuncțională care interacționează cu peste 100 de proteine, inclusiv cele implicate în transcripție, semnalizare celulară și transport intracelular , oferind astfel alte căi de tratament . Lucrările recente s-au concentrat asupra rolului mHtt în perturbarea reglării transcripționale .

La persoanele cu boala Huntington , debutul bolii Huntington este asociat cu scăderea nivelurilor de ARNm pentru genele care codifică anumiți receptori neurotransmițători . Într -un model transgenic de șoarece cu boala Huntington, cercetătorii au folosit cipuri de ADNc pentru a examina aproximativ 6.000 de ARNm ale celulelor striatale și au descoperit niveluri de ARNm pentru un set mic de gene implicate în căile de semnalizare critice pentru funcția celulelor striatale . Rezultate similare au fost obținute cu un alt model transgenic de șoarece cu boala Huntington, iar aceste date sunt în concordanță cu descoperirile pacienților cu boala Huntington , care au indicat expresia genelor aberantă ca fiind una dintre cauzele care stau la baza bolii Huntington. Forma mutantă a Htt interacționează cu și se leagă de diverși factori de transcripție și poate altera modelele de expresie genică , făcând aceste proteine indisponibile . Unele proteine care interacționează cu Htt prezintă activitate de modificare a histonei și au fost găsite în agregatele de proteine Htt din creierul șoarecilor transgenici cu boala Huntington și la pacienții cu boala Huntington .

Folosind șoareci transgenici HD , mai multe echipe au demonstrat că medicamentele care modifică modificarea histonelor cresc șansele de supraviețuire și reduc moartea celulară. Medicamente similare sunt utilizate în prezent în studii clinice cu pacienți afectați de boala Huntington , iar alte medicamente sunt testate pe modele murine în scopuri terapeutice .

Caracteristici comportamentale complexe: schizofrenie

Deși tehnicile genomice au fost utilizate cu succes pentru a identifica alelele mutante asociate cu tulburări comportamentale - monogenice (cum ar fi boala Huntington) , alte comportamente sunt poligenice și au componente de mediu puternice, ceea ce face ca genetica lor să fie mai dificil de analizat . De exemplu, schizofrenia este o tulburare cerebrală care afectează aproximativ 1 % din populație și este un exemplu de boală genetică complexă . Schizofrenia este un set de tulburări mintale caracterizate prin evitarea contactului social și prin comportamente ciudate, uneori delirante . Persoanele cu această boală nu pot duce o viață normală și sunt cu dizabilități cronice din cauza simptomelor lor. Este în mod clar o tulburare familială , rudele schizofrenicilor având o incidență mult mai mare a bolii decât populația generală (Figura 24.10). În plus , cu cât relația genetică sau biologică este mai apropiată de o persoană afectată , cu atât este mai mare probabilitatea ca persoana să dezvolte boala . Studiile pe gemeni au ajutat la stabilirea unei legături între genetică și schizofrenie . Dacă ambii gemeni exprimă o trăsătură , se spune

...

Gemenii MZ
Descendenți ai
împerecherilor
duble
Gemenii DZ
Frați cu unul dintre
părinții afectați
Copii

Frați

Părinți
Frați vitregi

Nepoți

Nepoții

Unchi

verișori primari

Baza

FIGURA 24.10 Riscul relativ pe durata vieții de a dezvolta schizofrenie, pentru persoanele fără legătură de rude și pentru rudele unui schizofrenic.

Gemenii sunt concordanți pentru trăsătura respectivă; dacă un geamăn exprimă trăsătura, dar celălalt nu, se spune că sunt discordanți pentru trăsătura respectivă . În studiile privind schizofrenia cu gemeni monozigoți și dizigoți, concordanța este mai mare la gemenii monozigoți decât la gemenii dizigoți. Deși aceste rezultate sugerează o componentă genetică, ele nu dezvăluie o bază genetică precisă pentru schizofrenie. Alte studii au evidențiat importanța efectelor pleiotropiei, epistazei și factorilor de mediu comuni în dezvoltarea acestei tulburări. Convingerea actuală este că schizofrenia este o tulburare de neurodezvoltare mediată genetic, dar nu determinată genetic. Contribuțiile geneticii la schizofrenie s-au dovedit dificil de identificat. Moștenirea monohibridă simplă, moștenirea dihibridă și controlul mai multor gene au fost toate excluse ca și cauze ale schizofreniei. Nu pare probabil ca doar unul sau două loci să fie implicați și nici nu este probabil ca tulburarea să fie strict cantitativă, ca în cazul moștenirii poligenice. În prezent, schizofrenia este considerată o afecțiune multifactorială și - cantitativă, influențată de gene, mediu și interacțiunile dintre genotip și factorii de mediu .

Căutarea rolului pe care genele îl joacă în schizofrenie a mers în paralel cu dezvoltarea tehnologiilor care permit noi metode de identificare a genelor asociate cu trăsături complexe. La sfârșitul anilor 1980, studiile de linkage utilizând markeri RPLP au identificat regiuni cromozomiale care segregau în familiile cu membri afectați de această tulburare. Până în anul 2000, un număr mic de gene candidate fuseseră identificate pe cromozomii 6, 8 și 13. Funcția unora dintre proteinele codificate în transmiterea impulsurilor nervoase susține ideea că aceste gene ar putea juca un rol în schizofrenie, deși există unele controverse cu privire la importanța lor în procesul bolii .

Noile metode experimentale dezvoltate în timpul și după Proiectul Genomului Uman au utilizat hărți haplotipale și tehnici de secvențiere de mare randament pentru a studia schizofrenia . Printre aceste metode principale se numără studiile de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) , care utilizează unele dintre cele peste 10 milioane de polimorfisme nucleotidice unice (SNP) prezente în genomul uman (SNP-urile au fost discutate în Capitolul 21). Subseturi de 300.000 până la 500.000 de SNP-uri , organizate în grupuri strâns legate numite haplotipuri și dispersate în întregul genom, sunt utilizate cu platforme de secvențiere pentru a examina mii de genomuri , căutând o asociere între haplotipuri și o trăsătură - în acest caz , schizofrenia (Figura 24.11). Haplotipurile sunt markeri care identifică regiunile cromozomiale ce pot conține gene asociate cu schizofrenia .

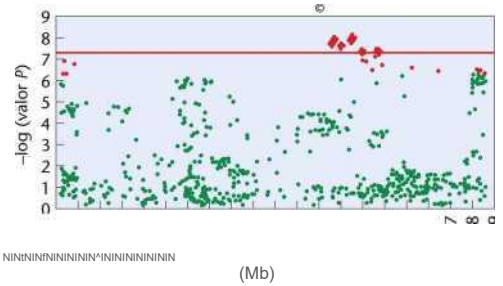


FIGURA 24.11 Rezultatele unui studiu de asociere la nivelul întregului genom pentru a investiga legătura dintre SNP-uri și schizofrenie pe cromozomul 6p22.1. SNP-urile peste pragul statistic de asociere (linia roșie) sunt reprezentate prin romburi roșii . Șapte SNP-uri care acoperă 209 kb de ADN prezintă semnificație statistică. Cercurile roșii reprezintă SNP-urile aflate la pragul de semnificație statistică , iar cercurile verzi indică SNP-urile fără asociere. Axa X marchează locația SNP-urilor în milioane de perechi de baze (Mb) în regiunea 6p22.1.

Studiul GWAS asupra schizofreniei indică faptul că nu există o singură genă sau alelă care să contribuie semnificativ la această tulburare. În schimb , rezultatele indică implicarea a sute de gene, fiecare dintre acestea contribuind într-o mică măsură la schizofrenie . Studiile GWAS se bazează pe presupunerea că anumite variante genetice comune (prezente la mai mult de 5% din populație) contribuie la riscul de a dezvolta boala (ipoteza bolii comune/variantei comune sau CDCV). În acest caz, variantele comune identificate prin studiile GWAS contribuie doar cu aproximativ 4 până la 30% la riscul de a dezvolta schizofrenie.

Incapacitatea studiilor de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) de a identifica majoritatea genelor care constituie factori de risc pentru schizofrenie și alte tulburări a generat dezbateri în rândul geneticienilor umani. Unii susțin că, prin creșterea semnificativă a numărului de genomuri analizate, GWAS ar putea identifica multe gene cu efect mic asociate cu o anumită tulburare. Alții subliniază că nu există nicio modalitate de a ști ce dimensiune a eșantionului este necesară pentru a identifica toate genele care contribuie la o anumită tulburare și, prin urmare, consideră că GWAS ar putea fi abordarea greșită. Din această perspectivă , ei consideră că căutarea unor variante alele rare care pot fi asociate cu tulburări relativ comune (ipoteza bolii comune/variantei rare, CDRV) ar putea fi cea mai bună strategie pentru identificarea alelelor responsabile pentru multe tulburări complexe. Resecvențierea la scară largă a întregului genom a fost propusă pentru a identifica variantele alele asociate cu relațiile genă-fenotip. Alți geneticieni susțin că alte mecanisme, cum ar fi interacțiunile genă-genă, interacțiunile proteină-proteină , modificările epigenetice sau variațiile numărului de copii (CNV), pot juca un rol important în schizofrenie și alte boli psihiatrice.

CNV-urile *de novo* , reprezentând atât deleții, cât și duplicații, sunt de trei până la patru ori mai frecvente în cazurile de schizofrenie decât la indivizii normali. Multe gene din aceste CNV-uri sunt implicate în dezvoltarea creierului, oferind indicii despre baza celulară a schizofreniei. Acest studiu a fost urmat de un altul care a arătat că CNV-urile distribuite în alte regiuni ale genomului sunt reprezentate disproporționat în schizofrenie; această constatare evidențiază necesitatea utilizării unor tehnici diverse pentru analiza acestei tulburări comportamentale complexe și a altora.

Schizofrenia și autismul sunt tulburări neurodezvoltării înrudite

Ca și în cazul schizofreniei , studiile familiale și pe gemeni arată că tulburările din spectrul autist (TSA) sunt tulburări complexe , multifactoriale, cu o componentă genetică. Se estimează că TSA afectează aproximativ 3,4 din 1.000 de copii cu vârste cuprinse între 3 și 10 ani. Aceste tulburări sunt caracterizate prin deficite severe în (1) gândire, (2) abilități lingvistice, (3) emoții și (4) interacțiune socială . Aceste tulburări variază de la forma severă, cunoscută sub numele de autism , până la o formă ușoară, cunoscută sub numele de sindrom Asperger , cu niveluri intermediare de severitate.

Unele mutații rare și rearanjări cromozomiale sunt asociate cu tulburări din spectrul autist, dar, împreună, explică doar între 5 și 15% din cazuri. Rezultatele studiilor GWAS au identificat polimorfisme SNP asociate cu susceptibilitatea la TSA . Unele dintre aceste SNP-uri sunt, de asemenea, factori de risc pentru schizofrenie, sugerând că aceste tulburări ar putea fi înrudite. Alte studii relevă existența unor variante rare ale numărului de copii (CNV) asociate cu dezvoltarea ambelor tulburări .

care acoperă șapte regiuni genomice au fost asociate atât cu schizofrenia, cât și cu TSA (Tabelul 24.3). În două dintre aceste regiuni, delețiile sunt asociate cu un risc crescut

TABELUL 24.3 Frecvențele CNV ale delețiilor și duplicărilor asociate cu autismul și schizofrenia .

Locusul CNV	Stare	Cazuri de ștergere	Cazuri de duplicare
1q21.1	Autism	2	10
	Schizofrenie	15	**4**
15q13.3	Autism	**3**	**2**
	Esquizofrenie	10	**4**
16p11.2	Autism	14	**5**
	Esquizofrenie	**5**	24
16p13.1	Autism	**0**	3
	Esquizofrenie	8	23 de ani
17p12	Autism	**4**	**1**
	Esquizofrenie	**8**	**0**
22q11.21	Autism	**1**	8
	Schizofrenie	16	**1**
22q13.3	Autism	5	**0**
	Schizofrenie	**0**	4

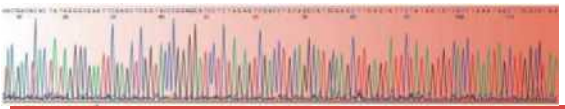
Intrările scrise cu caractere aldine indică faptul că CNV este semnificativ statistic ca factor de risc pentru afecțiunea indicată.

***Sursă:* Crespi, B, et al., 2010. Genomică comparativă a autismului și schizofreniei. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107: 1736-1741; Tabelul 1, p. 1737. Contact: crespi@*sfu.ca**

în autism, iar duplicațiile sunt asociate cu un risc crescut de schizofrenie (16p11.2 , 22ql3.3). În alte două cazuri (1q21.1 , 22ql1.21), delețiile cresc riscul de schizofrenie, iar duplicațiile sunt asociate cu TSA. Regiunea din 16pl3.1 susține modelul care postulează suprapunerea dintre cele două tulburări.

Studiile ulterioare au arătat că genele din aceste regiuni cromozomiale joacă roluri importante în dezvoltarea celulelor creierului, maturarea sinapselor și interconectarea neuronală. Aceste gene au fost cartografiate pe căi funcționale folosind metode de biologie sistemică, dezvăluind noduri interconectate de interacțiune genică ce joacă un rol semnificativ în formarea și funcționarea unor părți ale sistemului nervos.

Profilurile de expresie arată că schizofrenia și tulburările din spectrul autist sunt două fețe ale aceleiași monede. TSA este asociat cu o activitate crescută în aceste căi de dezvoltare , ceea ce duce la o creștere excesivă a celulelor și la dimensiuni mai mari ale creierului și capului , în timp ce schizofrenia este caracterizată printr- o activitate redusă în aceste căi, rezultând o creștere mai lentă a dezvoltării și dimensiuni mai mici ale creierului și capului . Atribuirea altor gene din aceste regiuni cromozomiale unor rețele funcționale ar trebui să ne ajute să înțelegem dezvoltarea normală a creierului și natura defectelor de reglare genică asociate atât cu schizofrenia , cât și cu autismul.



EXPLORARE DE GENOMICĂ

Área de estudio. Exploración de la Genómica

HomoloGene: căutarea genelor comportamentale

ȘI În acest capitol , am discutat unele dintre complexitățile - implicate în înțelegerea comportamentului - la oameni și la alte specii - ca produs atât al genelor, cât și al mediului. În acest exercițiu, vom explora baza de date HomoloGene a NCBI pentru a localiza genele implicate în comportament . HomoloGene este o bază de date cu omologi de la diverse specii eucariote și conține gene care au fost legate de caracteristici comportamentale atât la modelele animale , cât și la oameni . Unele dintre acestea sunt gene mutante care, pe baza polimorfismelor cu un singur nucleotid sau a mapării linkage-urilor , se consideră că contribuie la un anumit fenotip comportamental. Rețineți că corelarea unei gene cu un anumit comportament nu înseamnă neapărat că gena este cauza acelui comportament. Nici nu înseamnă că gena este singura implicată într-o caracteristică comportamentală sau că caracteristica se datorează în întregime geneticii . În orice caz, explorarea bazei de date Homolo Gene este o modalitate interesantă de a căuta gene presupuse a fi legate de comportament și de a afla mai multe despre ele.

■ Exercițiul I. HomoloGene

1. Accesați **HomoloGene prin intermediul site-ului ENTREZ la adresa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi .**
2. **Căutați HomoloGene folosind următoarea listă de termeni legați de caracteristicile comportamentale la oameni. Ce gene umane sunt enumerate în primele două categorii de gene omoloage obținute atunci când efectuați o căutare HomoloGene pentru fiecare caracteristică? Enumerați aceste gene și identificați locusurile lor cromozomiale. Notați lista altor specii despre care se crede că au omologi în comun pentru fiecare genă.**
   a) **Alcoolism .**
   b) **Depresie .**
   c) *Dependența* **de nicotină**
   d) **Tulburare afectivă** *sezonieră*
   e) **Inteligență**
3. **Pentru fiecare dintre cele două categorii principale de omologi, faceți clic pe titlul categoriei pentru a deschide un raport despre genele respective . Apoi , utilizați linkurile pentru genele individuale pentru a afla mai multe despre funcțiile lor . Pe lângă alte resurse utile, secțiunea *Linkuri suplimentare* din partea de jos a fiecărei pagini cu raportul genetic vă va oferi acces la site-ul web Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) , pe care l-am folosit în alte exerciții.**
4. **Căutați în HomoloGene orice comportament de interes pentru a vedea dacă baza de date conține gene care ar putea fi implicate în acel comportament.**

STUDIU DE CAZ | Modele de primate pentru studiul tulburărilor umane

Boala Huntington (BH) este o tulburare neurodegenerativă - dominantă , moștenită , cu simptome care debutează la vârsta adultă, afectând aproximativ 1 din 10.000 de persoane . Se manifestă de obicei în jurul vârstei de 50 de ani , nu are leac , duce inevitabil la demență și pierderea controlului motor și este fatală. Pentru a studia mecanismele celulare și moleculare asociate cu această boală, au fost create modele animale, inclusiv șoareci și *Drosophila* , prin transferul de gene BH umane mutante în aceste organisme. Cu toate acestea , unele dintre modificările comportamentale observate la musculițele de fructe și la șoarecii BH sunt dificil de corelat cu cele observate la persoanele cu această boală. Pentru a reproduce mai precis modificările cognitive și motorii ale bolii Huntington , cercetătorii au creat un model de primată folosind macaci rhesus, care se numără printre cele mai apropiate rude ale noastre și au multe asemănări cu oamenii, inclusiv durata de viață, metabolismul celular și funcțiile endocrine și reproductive. Cu toate acestea, utilizarea sa ridică mai multe întrebări importante.

1. Ce probleme etice apar din utilizarea modelelor pe primate pentru cercetarea bolilor umane ?
2. Pare probabil ca rezultatele obținute folosind macaci rhesus să poată fi traduse direct într-o înțelegere a procesului bolii la oameni și să conducă la un tratament?
3. Dacă modelul primatelor HD are succes, ar trebui aceste primate folosite pentru a studia alte tulburări comportamentale umane, cum ar fi boala Alzheimer sau Parkinson ?

Puntos de resumen

1. Comportamentul este o trăsătură multifactorială controlată de gene, factori de mediu și interacțiunile dintre aceste gene și mediu.
2. Metoda de analiză comportamentală poate genera tulpini care prezintă comportamente specifice, dar nu poate fi utilizată pentru a identifica genele asociate cu aceste comportamente.
3. Metoda de analiză genă cu genă poate fi utilizată pentru a analiza efectul unei singure gene asupra comportamentelor complexe controlate de mai multe gene, dar este dificil de utilizat în studiul variațiilor care apar în mod natural.
4. Datorită numărului mare de resurse genetice disponibile, *Drosophila și alte organisme sunt utile* în studiul tulburărilor de comportament uman .
5. Tehnologia genomică a deschis noi căi de cercetare asupra dezvoltării sistemului nervos uman, precum și asupra mecanismelor tulburărilor de comportament.

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Tulburarea bipolară este o boală mintală asociată cu o alternanță marcată și continuă între stări de spirit extreme . Se estimează că 1 din 100 de persoane a experimentat sau va experimenta această tulburare cel puțin o dată în viață. Studiile genetice indică faptul că tulburarea bipolară este familială și că sunt implicate mutații în mai multe gene . În încercarea de a identifica genele asociate cu tulburarea bipolară (cunoscută anterior sub numele de psihoză maniaco - depresivă), cercetătorii au început să utilizeze genetica convențională . În 1987, două studii separate care au utilizat analiza pedigree, analiza RFLP și o varietate de alți markeri genetici au raportat o legătură între psihoza maniaco-depresivă și markerii de pe cromozomul X într-un raport și de pe brațul scurt al cromozomului 11 în celălalt. La acea vreme, aceste rapoarte au fost salutate ca descoperiri majore. Se credea că genele care controlează această tulburare comportamentală ar putea fi identificate, cartografiate și secvențiate în același mod ca genele legate de fibroza chistică, neurofibromatoză și alte boli . Se spera că această descoperire va deschide calea pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice bazate pe cunoașterea naturii produsului genetic și a mecanismului său de acțiune. Una dintre provocările din genetica umană provine din faptul că unele boli au timpi de debut variabili , iar studiile asupra tulburării bipolare sunt un exemplu în acest sens. După analiza inițială de identificare a markerilor, unii dintre controale (indivizi neafectați de boală) cărora le lipseau markerii au dezvoltat ulterior tulburare bipolară . Acest rezultat a slăbit ipoteza unei legături . Aceste descoperiri nu exclud rolul unora dintre genele majore de pe cromozomul X și cromozomul 11 în tulburarea bipolară , dar exclud o legătură cu markerii utilizați în rapoartele originale . Acest eșec nu numai că a cauzat jenă și confuzie, dar a forțat și o reexaminare a validității noilor metode bazate pe ADN recombinant

utilizate pentru a cartografia alte gene umane și a analizelor datelor studiilor de linkage care implică trăsături complexe, legate de comportament. Au fost propuși mai mulți factori pentru a explica concluziile eronate la care s-a ajuns în studiile originale. Care credeți că au fost acești factori?

Soluție. Deși unele critici au fost îndreptate către alegerea markerilor, majoritatea factorilor implicați în această tulburare par a fi legați de fenotipul psihozei maniaco-depresive . Au fost identificați cel puțin trei factori care ar fi putut duce la interpretări greșite. Unul este legat de diagnosticul tulburării bipolare în sine. Fenotipul este complex și nu poate fi cuantificat la fel de ușor ca înălțimea sau greutatea. Mai mult, schimbările de dispoziție sunt o parte universală a vieții de zi cu zi și nu este întotdeauna ușor să se distingă schimbările tranzitorii de dispoziție și rolul factorilor de mediu de bolile care au o bază biologică sau genetică (sau ambele) . Al doilea factor este că , în populațiile studiate , ar putea fi de fapt mai mult de una dintre principalele gene legate de X și mai mult de una dintre principalele gene autozomale care declanșează tulburarea bipolară . Al treilea factor este vârsta de debut. Există o corelație pozitivă între vârstă și debutul simptomelor tulburării bipolare . Prin urmare , în momentul studierii genealogiei, tinerii care ar fi afectați ulterior nu prezintă semne ale bolii . Luați împreună, acești factori ilustrează dificultatea investigării bazei genetice a trăsăturilor comportamentale complexe. Individual sau în combinație, factorii descriși pot influența rezultatele - suficient de mult încât logica demonstrației adecvată pentru alte trăsături să nu fie suficient de riguroasă pentru trăsăturile comportamentale cu fenotipuri complexe și cauze subiacente complexe .

Problemas *y* preguntas para la discusión

2. De unde știm?

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra modului în care genele care controlează dezvoltarea, structura și funcția sistemului nervos, precum și interacțiunile acestora cu factorii de mediu, dau naștere comportamentului. Pe parcursul acestui proces, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentul care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum știm dacă există variație genetică pentru un anumit comportament prezentă în tulpinile unei anumite specii?
   (b) De unde știm că geotaxia la *Drosophila* este sub control genetic?
   (c) De unde știm că *Drosophila* poate învăța și aminti?
   (d) De unde știm cum funcționează produsul genei mulan în boala Huntington?
   (e) De unde știm că schizofrenia are componente genetice?
2. Comparați cele două abordări principale utilizate în studiul geneticii comportamentale. Care sunt avantajele și dezavantajele fiecărei metode, în funcție de tipul de informații obținute?
3. Oamenii percep gustul compusului chimic feniltiocarbamidă (PTC) ca fiind foarte amar sau fără gust. Când sunt examinați urmașii diferitelor combinații de persoane care gustă și nu gustă, se obțin următoarele rezultate:

Părinți	Descendenți
Ambele gusturi	Toate gusturile
Ambele gusturi	1/2 apreciază, 1/2 nu apreciază
Ambele gusturi	3/4 degustători 1/4 persoane care nu le plac

Unuia îi place și altuia nu. Tuturor le place.

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

Părinți	Descendenți
Unul simpatic Unuia nu-i place. Amândurora nu-i place.	1/2 degustări 1/2 persoane care nu apreciază Toate persoanele care nu apreciază

Pe baza acestor date, cum se moștenește comportamentul de a aprecia PTC ?

4. Jerry Hirsch și colegii săi au folosit abordarea analizei comportamentale pentru a studia genele responsabile de geotaxie la *Drosophila*. Eleganta lor analiză genetică a demonstrat că acest comportament este sub control genetic, iar cercetătorii au estimat numărul de gene responsabile de comportamentul geotactic. Deși abordarea a avut succes, care sunt limitele abordării analizei comportamentale utilizate în acest caz? Ce pași au făcut Hirsch și colegii săi pentru a depăși aceste limitări? A fost această abordare satisfăcătoare?
5. Diverse abordări au fost aplicate în studiul geneticii tulburării de jocuri de noroc (tendința patologică de a juca jocuri de noroc), iar proclivitatea în cadrul unei singure familii a fost bine documentată. Cu toate acestea , studiile familiale, deși au arătat grupuri de rude de sânge, nu au reușit să separe influențele genetice de cele de mediu . Eisen (2001) a aplicat tehnica studiului gemenilor folosind 3.359 de perechi de gemeni din Registrul de Gemeni din Era Vietnamului și *a constatat* că o parte substanțială a variației asociate cu tulburarea de jocuri de noroc poate fi atribuită factorilor ereditari . Cum pot fi utilizate studiile pe gemeni pentru a distinge factorii de mediu de cei genetici în trăsăturile comportamentale complexe , cum ar fi tulburarea de jocuri de noroc?
6. *Caenorhabditis elegans* a devenit un organism model valoros pentru studiul dezvoltării și geneticii din mai multe motive . Dezvoltarea fiecărei celule a fost cartografiată (1.031 la masculi și 959 la hermafroditi). *C. elegans* Are doar 302 neuroni, al căror model de conectivitate este cunoscut, și prezintă o serie de comportamente interesante, inclusiv chemotaxia, termotaxia și împerecherea, ca să numim doar câteva. În plus,

establecido lineas isogénicas. ¿Qué ventaja tendría C. *elegans* sobre otros organismos para utilizarlo como modelo en el estudio del comportamiento animal? ¿Cuáles son las desventajas probables?

7. Utilizando los fenotipos conductuales de una serie de 18 mutantes pertenecientes a cinco clases fenotípicas, Thomas (1990) describió el programa genético que controla el motor de defecación cíclico en *Caenorhabditis elegans.* El primer paso de cada ciclo consiste en la contracción de los músculos posteriores del cuerpo, seguida por la contracción de los músculos anteriores del cuerpo. Para terminar, los músculos anales se abren y expulsan el contenido de los intestinos. En la tabla de la columna siguiente se proporciona una lista (simplificada) de mutantes seleccionados que exhiben defectos en el proceso de defecación.

Realice un esquema simple que ilustre las bases genéticas del proceso de defecación de *C. elegans.* Explique la acción del gen 9. *aex* y especule acerca del papel y la ubicación del gen *cha.*

8. Explique por qué el estudio de la genética del comportamiento en los seres humanos se ha quedado rezagado respecto del de otros organismos.

Fenotipul genei	
exp	Eșecul de a deschide anusul și de a expulza conținutul intestinal.
une	Eșecul de a contracta mușchii anteriori ai corpului. *pbo* Eșecul de a contracta mușchii posteriori ai corpului.
aex	Incapacitatea de a deschide anusul și de a expulza conținutul intestinal și incapacitatea de a contracta mușchii anteriori ai corpului.
Modificarea	perioadei ciclului; toate celelalte componente sunt complet funcționale.

JP Scott și JL Fuller au studiat 50 de trăsături la cinci rase de câini de rasă pură. Aproape toate trăsăturile au variat semnificativ între cele cinci rase, deși câteva au rămas constante în toate încrucișările. Ce putem concluziona despre controlul genetic al acestor trăsături comportamentale?

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

10. Deși nu este explicat în acest capitol, C. *elegans* Este un sistem model al cărui ciclu de viață este o alegere excelentă pentru analiza genetică a multor procese biologice . C. *elegans* are două sexe naturale: hermafrodit și mascul . Hermafroditul este în esență o femelă care poate produce spermatozoizi, precum și ovocite, astfel încât reproducerea poate avea loc prin autofertilizarea hermafroditului sau prin împerechere hermafrodit-mascul . În contextul studierii mutațiilor din sistemul nervos, care este avantajul autofertilizării hermafroditelor în ceea ce privește identificarea mutațiilor recesive și propagarea tulpinilor mutante ?
11. Următoarele sunt date ipotetice privind efectul genetic al cromozomilor *Drosophila* asupra geotaxiei :

	Cromozom		
	X	2	3
Geotaxie pozitivă	+ 0,2	+0,1	+3,0
Neselectat	+0,1	„0,2	+1,0
Geotaxie negativă	-0,1	-2,6	+0,1

Care sunt concluziile tale ?

12. În iulie 2006 , o populație de muște *Drosophila melanogaster* a fost lansată la bordul navetei spațiale *Discovery* către Stația Spațială Internațională (*ISS*) , unde au fost efectuate o serie de observații și experimente de detectare a gravitației pe o perioadă *de* nouă generații. Astronauții au colectat specimene congelate și le-au returnat pe Pământ. Cercetătorii au corelat răspunsurile comportamentale și fiziologice la microgravitație cu modificările activității genelor, analizând profilurile proteinelor și ARN-ului. Titlul proiectului este „ Comportamentul și expresia genelor Drosophila în microgravitație ” . Dacă ați putea efectua trei experimente *asupra aspectelor comportamentului* acestor muște , care ar fi acestea? Cum ați testa modificările expresiei genelor ca răspuns la microgravitație? Deoarece oamenii au în comun aproximativ jumătate din genomul și proteinele lor cu Drosophila , Cum ați justifica investiția într- un astfel de proiect din punct de vedere al îmbunătățirii sănătății speciei umane ?
13. Dintre diversele abordări de cercetare care au fost aplicate în studiul schizofreniei , două dintre ele, studiile pe gemeni și analiza genomică , au oferit un sprijin important pentru teza componentei genetice .
    (a) Rezumați contribuția fiecăruia dintre ei la înțelegerea modului în care funcționează schizofrenia .
    (b) Speculați asupra valorii pe care analiza genomică, utilizând probe de la gemeni monozigoți și dizigoți, ar putea-o avea în avansarea cercetării asupra schizofreniei .
14. Descrieți utilizarea polimorfismelor cu un singur nucleotid (SNP) în studiul cauzelor genetice ale schizofreniei.
15. Autismul , o tulburare umană relativ frecventă și complexă , poate varia de la severă la ușoară. Ce dovezi sugerează o posibilă legătură între genetică și autism?
16. O descoperire interesantă și controversată a lui Wedekind și colegilor săi (1995) a sugerat că simțul mirosului , împreună cu mai multe haplotipuri HLA (antigen leucocitar uman), a jucat un rol în selecția partenerului la oameni . Femeile preferau tricourile purtate de bărbați cu haplotipuri HLA diferite de ale lor . Haplotipurile HLA sunt componente ale complexului major de histocompatibilitate (MHC) și sunt cunoscute pentru funcțiile imunologice importante . Pe lângă oameni , șoarecii și peștii își aleg, de asemenea, partenerii pe baza compoziției complexului MHC . Peștele stickleback (Gasterosteus *aculeatus*) Recent s - a studiat dacă femelele folosesc un sistem olfactiv bazat pe MHC pentru a selecta masculii . Examinați următoarele date (modificate după Milinski și colab., 2005) și oferiți o concluzie rezumativă. De ce ar putea organismele să dezvolte un sistem de selecție a partenerilor pentru a evalua și optimiza diversitatea MHC?

	Bărbat cu MHC Optimal	Bărbat cu MHCno optim
Timpul petrecut de femelele receptive (secunde)	350	250
Numărul de femele care au depus icre		

Tabelul compară alegerile bazate pe miros făcute de femelele receptive pentru masculii cu alele MHC optime și masculii cu alele MHC suboptime . Femelele receptive au selectat perioade de timp diferite (în secunde) pentru expunerea la masculi cu alele MHC optime și suboptime . Numărul de femele care au dat naștere atunci când au fost expuse la diferiți masculi cu complemente MHC diferite este , de asemenea , detaliat în tabel .

Estas mariquitas de la Sierra de Chiricahua, en Arizona, muestran una considerable variación fenotípica.

25

Genetica populațiilor și genetica evolutivă

CONCEPTE CAPITOL

►► **Majoritatea populațiilor și speciilor prezintă o variabilitate genetică considerabilă.**

►► **Această variabilitate se reflectă în diferențele alelice dintre populațiile unei specii.**

Relația dintre frecvențele alelelor și frecvențele fenotipice într - o populație ideală este descrisă de legea Hardy -Weinberg.

►► **Selecția, migrația și deriva genetică pot provoca modificări ale frecvenței alelelor.**

►► **Mutațiile creează noi alele în fondul genetic al unei populații.**

►► **Asocierile nealeatoare modifică frecvența genotipică a unei populații, dar nu și frecvența alelelor acesteia.**

O reducere a fluxului genetic între populații , însoțită de selecție sau derivă genetică , poate duce la izolare reproductivă și speciație.

►► **Diferențele genetice dintre populații sau specii sunt folosite pentru a reconstitui istoria evoluției .**

LA mijlocul secolului al XIX-lea , Alfred Russel Wallace și Charles Darwin au identificat selecția naturală ca mecanismul fundamental al evoluției. În cartea sa din 1859, *Originea speciilor,* Darwin a prezentat dovezi ample că populațiile și speciile nu sunt fixe, ci se schimbă sau evoluează în timp ca urmare a selecției naturale. Cu toate acestea, Wallace și Darwin nu au putut explica nici originea variațiilor care au furnizat materia primă pentru evoluție, nici mecanismele prin care aceste variații au fost transmise de la părinți la urmași. Gregor Mendel și-a publicat lucrarea despre moștenirea trăsăturilor în 1866, dar aceasta a trecut în mare parte neobservată la acea vreme. Redescoperirea lucrării lui Mendel în 1900 a lansat un efort de trei decenii pentru a reconcilia conceptul de gene și alele cu teoria evoluției prin selecție naturală. Pe măsură ce biologii secolului al XX-lea au aplicat principiile geneticii mendeliene populațiilor, aceștia au putut explica atât originea variației (mutația), cât și mecanismul moștenirii (segregarea alelelor). Astăzi, considerăm evoluția ca fiind o consecință a schimbărilor alelelor și frecvențelor alelelor în cadrul populațiilor de-a lungul timpului. Această uniune a geneticii populațiilor cu teoria selecției naturale a dat naștere unei noi perspective asupra procesului evolutiv numită *neo-darwinism.*

Pe lângă selecția naturală, alte forțe - inclusiv mutația, migrația și deviația - modifică individual și colectiv frecvențele alelelor, ducând la divergență evolutivă care poate duce în cele din urmă la speciație, formarea de noi specii. Speciația este facilitată de diversitatea mediului . Dacă o populație este distribuită într-o zonă geografică care cuprinde mai multe submedii ecologice distincte, cu presiuni selective variabile , populațiile izolate care ocupă aceste zone se pot adapta treptat și se pot distinge genetic unele de altele. Populațiile genetic distincte pot persista, pot dispărea, se pot recombina sau pot continua să divergă până când devin izolate reproductiv. Populațiile izolate reproductiv sunt considerate specii separate. Schimbările genetice din cadrul populațiilor pot modifica o specie în timp, o pot transforma într-o altă specie sau o pot determina să se divizeze în două sau mai multe specii.

Geneticienii populațiilor investighează modelele de variație genetică în cadrul și între grupurile de indivizi care se împerechează . Deoarece mutațiile modifică structura genetică a populațiilor și formează baza schimbărilor evolutive, genetica populațiilor a devenit o subdisciplină importantă a biologiei evolutive. În acest capitol, vom examina procesele microevoluției - definite ca schimbări evolutive în cadrul populațiilor unei specii - și apoi vom analiza modul în care aspectele moleculare ale acestor procese pot fi extinse la macroevoluție - definită ca seria de evenimente evolutive care duc la apariția altor specii și grupuri taxonomice.

25.1 Variația genetică este prezentă la majoritatea populațiilor și speciilor

O populație este un grup de indivizi aparținând aceleiași specii, care trăiesc într - o zonă geografică definită și care se împerechează sau sunt potențial de împerechere . Când ne gândim la o populație umană, o putem defini ca grupul de oameni care trăiesc în Statele Unite sau în Sri Lanka sau putem specifica o populație formată din toți locuitorii unui anumit oraș mic sau sat.

Informațiile genetice deținute de membrii unei populații constituie fondul genetic al acelei populații. La prima vedere, ar putea părea că o populație bine adaptată la mediul său trebuie să fie extrem de homozigotă, deoarece tindem să presupunem că alela cea mai favorabilă la fiecare locus va fi prezentă la o frecvență ridicată. Mai mult, o privire asupra majorității populațiilor de plante și animale dezvăluie multe asemănări fenotipice . Cu toate acestea , o gamă largă de dovezi indică faptul că, în realitate, majoritatea populațiilor conțin un grad ridicat de heterozigoție. Această diversitate genetică încorporată este adesea ascunsă, deoarece nu este neapărat evidentă din punct de vedere fenotipic ; prin urmare, detectarea acestei diversități nu este o sarcină simplă. Cu toate acestea, diversitatea în cadrul unei populații poate fi detectată folosind diverse metode.

Detectarea variației genetice prin selecție artificială

O modalitate de a determina dacă variația genetică afectează o trăsătură fenotipică este utilizarea selecției artificiale. Un fenotip care nu este asociat cu variația genelor care controlează fenotipul nu va răspunde la selecție; cu toate acestea , dacă există variație genetică, fenotipul se poate schimba în câteva generații. Un - exemplu foarte clar al acestui tip de dovadă este câinele domestic. Marea varietate de dimensiuni, culori și comportamente pe care le observăm la diferite rase de câini este rezultatul efectelor selecției asupra variației genetice

prezente la lupii sălbatici, din care descind toți câinii domestici. Dovezile genetice și arheologice indică faptul că domesticirea câinilor a avut loc acum cel puțin 15.000 de ani și, posibil, mult mai devreme. Pe o perioadă mai scurtă de timp, experimentele de selecție de laborator cu musca de fructe Drosophila melanogaster *au* generat schimbări semnificative în câteva generații care afectează aproape fiecare fenotip imaginabil, inclusiv dimensiunea, forma, rata de dezvoltare , fecunditatea și comportamentul.

Variații în secvența de nucleotide

Cea mai directă metodă de estimare a variației genetice este - compararea secvențelor de nucleotide ale genelor purtate de indivizii care alcătuiesc o populație. Pentru a face acest lucru, Martin Kreitman a analizat variația genei *alcool dehidrogenazei (Adh)* la *Drosophila melanogaster* . (Figura 25.1). La nivel proteic, această genă are două alele, *Adh-f și Adh-s.* Proteinele codificate diferă printr-un singur aminoacid (thr în loc de lys la codonul 192). Pentru a determina dacă cantitatea de variație genetică detectabilă la nivel proteic (o diferență de un aminoacid) corespunde cu variația la nivel de nucleotide, Kreitman a clonat și secvențiat genele *Adh* . a cinci populații naturale de *Drosophila* (Figura 25.2).

Cele 11 gene clonate, izolate din aceste cinci populații, - conțineau un total de 43 de variații de nucleotide în secvența de 2.721 de perechi de baze a genei *Adh.* Aceste variații sunt distribuite în întreaga genă: 14 în regiunile codificatoare exonice, 18 în introni și 11 în regiunile flancante netraduse. Dintre cele 14 variații ale regiunilor codificatoare , doar una duce la o substituție de aminoacizi - cea de la codonul 192, care produce cele două alele. Celelalte 13 substituții de nucleotide din regiunile codificatoare nu modifică aminoacidul codificat și, prin urmare, sunt variații silențioase ale acestei gene.

Să luăm un alt exemplu. Luați în considerare gena CF, care codifică regulatorul conductanței transmembranare a fibrozei chistice (CFTR), una dintre cele mai studiate gene umane. Mutațiile recesive ale

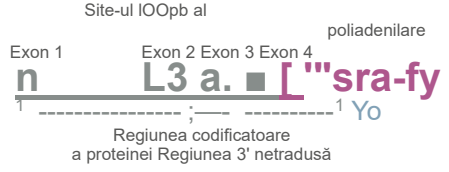


FIGURA 25.1 Organizarea locusului *Adh* al *Drosophila melanogaster.*

	Exonul 3	Intronul 3	Exon 4
Secuență acordul *Adh:*	C C CC	GGAA T	C TC C A'C T AG
Cepa			
Wa-S	TT • A	CA • TA	Aer condiționat .....
FI1-S	TT • A	CA • TA	Aer condiționat .....
Ja-S	• • • •	• • • • • •	... T.T. CA
FI-F	.....	.....	GTC T CC •
Ja-F	• • A •	• • G • •	• • CTC T CC •

În 1983, Macmillan Publishers Ltd.

FIGURA 25.2 Variația secvenței de ADN în anumite părți ale genei *Adh* de *Drosophila* într -o probă din cele 11 tulpini de laborator derivate din cele cinci populații naturale. Punctele reprezintă nucleotidele care corespund secvenței consens; literele reprezintă polimorfisme nucleotidice. Un polimorfism A/C (A*) la codonul 192 creează cele două alele Adh (F și S) . *Toate* celelalte polimorfisme sunt silențioase sau necodificatoare .

Pierderea funcției genei *CFTR* provoacă fibroză chistică , o boală care afectează glandele exocrine și plămânii, ducând la susceptibilitate la infecții bacteriene . Aproape 1.800 de mutații diferite au fost identificate în *gena CFTR.* Acestea includ mutații missense , deleții de aminoacizi , mutații nonsens, mutații de schimbare a cadrului de citire și defecte de splicing.

Figura 25.3 prezintă o hartă a celor 27 de exoni ai genei *CFTR* , unde mulți exoni sunt identificați în funcție de funcția lor. Histograma de deasupra hărții arată locația unor mutații care cauzează boala și numărul de copii ale fiecărei mutații identificate. O astfel de mutație, o deleție de 3 perechi de baze în exonul 10, denumită *AF508,* reprezintă 67% din toate alelele mutante ale fibrozei chistice, deși alte câteva mutații au fost prezente pe cel puțin 100 dintre cromozomii studiați. În populațiile de origine europeană, aproximativ 1 din 44 până la 1 din 20 de indivizi sunt purtători heterozigoți ai alelelor mutante. Rețineți că Figura 25.3 include doar variante de secvență care modifică funcția proteinei CFTR. Există, fără îndoială, mult mai multe alele *CFTR* cu variante de secvență silențioase care nu modifică secvența de aminoacizi a proteinei și nu îi afectează funcția.

Studiile efectuate asupra altor organisme, inclusiv șobolanul, șoarecele și planta de muștar *Arabidopsis thaliana,* au produs - estimări similare ale diversității nucleotidelor în diverse gene. Rezultatele indică prezența unui vast rezervor de variabilitate genetică în majoritatea ...

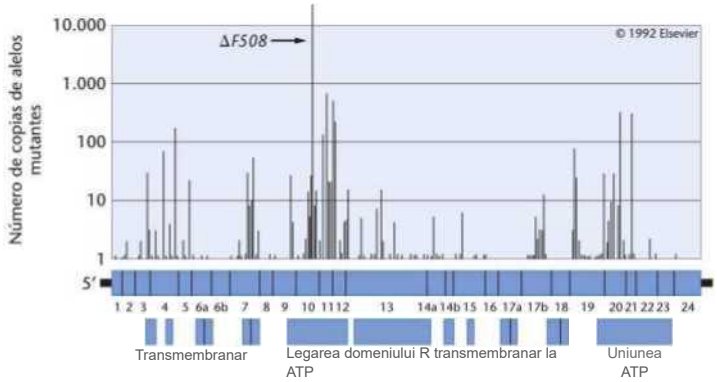


FIGURA 25.3 Poziţiile mutaţiilor cauzatoare de boală în gena fibrozei chistice . Histograma arată numărul de copii ale fiecărei mutaţii găsite de geneticieni. (Axa verticală este pe o scară logaritmică.) Harta genetică de sub histogramă arată locaţiile şi dimensiunile relative ale celor 27 de exoni ai ***locusului CFTR.*** Casetele din partea de jos indică funcţiile diferitelor domenii ale proteinei CFTR.

al populaţiilor şi arată că, la nivel de ADN, majoritatea genelor (dacă nu toate) prezintă o oarecare diversitate de la un individ la altul. Alelele care reprezintă aceste variaţii sunt distribuite între membrii unei populaţii.

Explicaţia nivelului ridicat de variaţie genetică în populaţii

Descoperirea că populaţiile prezintă o variaţie genetică considerabilă în ceea ce priveşte nivelurile de aminoacizi şi nucleotide a fost surprinzătoare pentru mulţi biologi evoluţionişti . Consensul de până atunci era că selecţia ar tinde să favorizeze o singură alelă optimă (tipul sălbatic) la fiecare locus şi că, prin urmare, populaţiile ar avea niveluri ridicate de homozigoţie. Această presupunere s-a dovedit în mod concludent a fi falsă, stârnind dezbateri considerabile şi un mare interes pentru investigarea - forţelor care menţin aceste niveluri ridicate de variaţie genetică.

Teoria neutră a evoluţiei moleculare, propusă de Kimura în 1968, postulează că mutaţiile care duc la substituţii de aminoacizi sunt de obicei dăunătoare , doar o fracţiune foarte mică fiind benefică. Unele mutaţii sunt neutre, adică sunt echivalente funcţional cu alela pe care o înlocuiesc. Mutaţiile benefice sau dăunătoare sunt conservate, respectiv eliminate din populaţie , prin selecţie naturală . Cu toate acestea, frecvenţa alelelor neutre într-o populaţie este determinată de ratele de mutaţie şi de deriva genetică aleatorie , nu de selecţie . Unele mutaţii neutre vor devia până când se vor fixa în populaţie; alte mutaţii neutre se vor pierde. În orice moment, o populaţie poate conţine mai multe alele neutre la orice locus particular. Prin urmare , diversitatea alelelor la majoritatea loci-urilor nu reflectă acţiunea selecţiei naturale , ci este o funcţie a mărimii populaţiei (populaţiile mai mari au mai multă variaţie) şi a procentului de mutaţii neutre .

Explicaţia alternativă pentru variabilitatea genetică surprinzător de mare a populaţiilor este selecţia naturală. Există mai multe exemple în care variaţiile enzimelor sau proteinelor sunt menţinute prin adaptarea la anumite condiţii de mediu. Un astfel de exemplu este avantajul binecunoscut pe care îl au heterozigoţii pentru anemia falciformă atunci când sunt infectaţi cu paraziţi ai malariei .

O diferenţă de adaptare de doar o fracţiune de unu procent ar fi suficientă pentru a menţine o astfel de variaţie , dar la acel nivel, prezenţa sa ar fi dificil de măsurat. Prin urmare , datele actuale sunt insuficiente pentru a determina ce fracţiune din variaţia genetică moleculară este neutră şi ce fracţiune este supusă selecţiei. Teoria neutră, însă , joacă un rol crucial . Ea subliniază faptul că variaţia genetică poate fi aşteptată pur şi simplu ca urmare a mutaţiei şi derivei. Mai mult, teoria neutră oferă o ipoteză de lucru pentru studiile evoluţiei moleculare . Cu alte cuvinte, biologii trebuie să găsească dovezi pozitive

că selecția acționează asupra frecvențelor alele la un anumit locus înainte de a putea respinge presupunerea mai simplă că doar mutația și deriva sunt în joc.

25.2

Legea Hardy-Weinberg descrie frecvențele alelelor și frecvențele genotipurilor populațiilor

Populațiile sunt dinamice; ele se extind și se contractă datorită ratelor de natalitate și mortalitate, migrației sau contactului cu alte populații. Adesea, unii indivizi dintr-o populație vor avea mai mulți urmași decât alții, contribuind cu o fracțiune mai mare din alelele lor la următoarea generație. Astfel, reproducerea diferențială în cadrul unei populații poate duce, în timp, la modificări ale frecvențelor alelelor și genotipurilor generațiilor ulterioare. Modificările frecvențelor alelelor în cadrul unei populații care nu duc la izolarea reproductivă ulterioară sunt exemple de microevoluție. În secțiunile următoare, vom analiza modificările microevoluționare din fondul genetic al populațiilor , iar mai târziu în capitol, ne vom concentra pe macroevoluție și pe procesul de speciație.

Adesea, atunci când examinăm un singur locus genetic într-o populație, constatăm că distribuția alelelor pentru acel locus produce indivizi cu genotipuri diferite. Calcularea frecvențelor alele și fenotipice în populație și determinarea modului în care aceste frecvențe variază de la o generație la alta sunt două elemente cheie ale geneticii populațiilor . Geneticienii populațiilor folosesc aceste calcule pentru a răspunde la întrebări precum: Câtă variație genetică există în cadrul unei populații? Genotipurile sunt distribuite aleatoriu în timp și spațiu sau există modele discernabile? Ce factori externi și interni afectează compoziția fondului genetic al unei populații? Produc acești factori divergență genetică între populații care ar putea duce la formarea de noi specii?

Relația dintre proporțiile relative ale alelelor în cadrul fondului genetic și frecvențele diferitelor genotipuri dintr-o populație a fost descrisă elegant la începutul secolului al XX-lea printr-un model matematic simplu, dezvoltat independent de matematicianul britanic Godfrey H. Hardy și medicul german Wilhelm Weinberg. Acest model, cunoscut sub numele de legea Hardy-Weinberg, descrie ce se întâmplă cu alelele și genotipurile într -o populație „ideală" care este infinit de mare, în care împerecherile sunt aleatorii și care nu este supusă niciunei forțe evolutive , cum ar fi mutația, migrația sau selecția. În aceste condiții, modelul Hardy-Weinberg face două predicții:

1. Frecvențele alelelor din fondul genetic nu variază în timp.
2. Dacă examinăm două alele la un locus, Aya, atunci (așa cum vom vedea mai târziu în capitol) după o generație de împerechere aleatorie, frecvențele genotipurilor AA *:Aa:aa* în cadrul populației pot fi calculate folosind formula

pagina $^2 + 2pq + q^2 = 1$

unde p este frecvența alelei A și q este frecvența alelei a .

O populație care îndeplinește aceste criterii și în care frecvențele lui p Dacă două alele la un anumit locus au ca rezultat frecvențele genotipice prezise, se spune că aceasta se află în echilibru Hardy-Weinberg. După cum vom vedea mai târziu în acest capitol, este rar ca o populație reală să se potrivească perfect modelului Hardy-Weinberg și ca frecvențele alelelor și genotipurilor să rămână neschimbate de la o generație la alta.

Modelul Hardy-Weinberg folosește principiile mendeliene ale segregării, împreună cu teoria probabilităților simple , pentru a explica relațiile dintre frecvențele alelelor și genotipurilor într-o populație. Pentru a demonstra cum funcționează acest lucru, să luăm în considerare un singur locus autosomal cu două alele , Aya, într-o populație în care frecvența lui A este 0,7 , iar frecvența lui *a este 0,7.* este 0,3. Rețineți că 0,7 + 0,3 = 1, ceea ce indică faptul că luăm în considerare toate alelele genei A prezente în fondul genetic. Presupunem că indivizii se împerechează aleatoriu, conform cerințelor stabilite de Hardy- Weinberg , astfel încât pentru orice zigot , probabilitatea ca gametul feminin să conțină A este 0,7 , iar probabilitatea ca gametul masculin să conțină A este , de asemenea, 0,7. Probabilitatea ca *ambele* Probabilitatea ca gameții să conțină A este de 0,7 x 0,7 = 0,49. Prin urmare, prezicem că genotipul AA va apărea în 49 % din cazuri . Probabilitatea formării unui zigot dintr-un gamet feminin care poartă A și un gamet masculin care poartă *un* Probabilitatea ca un gamet femel purtător de a *fi* fertilizat de un gamet masculin purtător de A este de 0,7 × 0,3 = 0,21, iar probabilitatea ca un gamet femel purtător de a fi fertilizat de un gamet masculin purtător de A este de 0,3 × 0,7 = 0,21 , deci frecvența genotipului Aa va fi 0,21 + 0,21 − 0,42 = 42%. În cele din urmă, probabilitatea ca un zigot să se formeze din doi gameți purtători *de a* este de 0,3 × 0,3 = 0,09, deci frecvența genotipului aa *va* fi de 9 % .

Pentru a verifica calculele noastre, rețineți că 0,49 + 0,42 + 0,09 = 1,0, ceea ce confirmă că am luat în considerare toți zigoții. Aceste calcule sunt rezumate în Figura 25.4.

După cum puteți vedea, am început cu frecvența unei alele specifice într-un anumit fond genetic și am calculat probabilitatea ca anumite genotipuri să apară din acest fond genetic. Când zigoții se dezvoltă în organisme adulte și se reproduc, care va fi distribuția frecvenței alelelor în noul fond genetic? Conform ipotezelor legii Hardy-Weinberg, presupunem că toate genotipurile au rate identice de supraviețuire și reproducere. Aceasta înseamnă că, în următoarea generație, toate genotipurile vor contribui în mod egal la noul fond genetic. Indivizii *AA* reprezintă 49% din populație și putem prezice că gameții pe care îi produc vor constitui 49% din fondul genetic. Toți acești gameți poartă alela A. În mod similar, indivizii *Aa* constituie 42% din populație, așa că prezicem că gameții lor vor constitui 42% din noul fond genetic. Jumătate (0,5) dintre acești gameți vor purta alela *A*. Prin urmare, frecvența alelei *A* în fondul genetic va fi 0,49 + (0,5)0,42 = 0,7. Cealaltă jumătate a gameților produși de indivizii *Aa* vor purta alela a . Indivizii *Aa* constituie 9% din populație, deci gameții lor vor constitui 9% din noul fond genetic. Toți acești gameți poartă alela a . Prin urmare, putem prezice că alela a *din* noul fond genetic va avea o probabilitate egală cu (0,5)0,42 + 0,09 = 0,3. Pentru a verifica calculele noastre

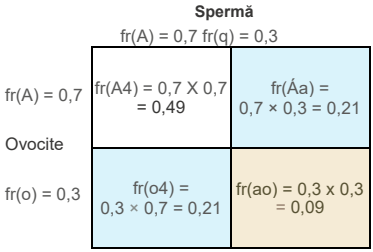


FIGURA 25.4 Calculul frecvențelor genotipice din frecvențele alelelor. Gameții reprezintă mostre prelevate din fondul genetic pentru a forma genotipurile generației următoare. În această populație, frecvența alelei *A* este 0,7, iar frecvența alelei *a* este 0,3. Frecvențele calculate ale genotipurilor generației următoare vor fi 0,49 pentru *AA*, 0,42 pentru *Aa* și 0,09 pentru *aa*. Conform legii Hardy-Weinberg, frecvențele lui A și *a* rămân *constante* de la o generație la alta. Rețineți că 0,7 + 0,3 = 1,0, deci toți gameții din fondul genetic al noii generații sunt reprezentați .

Am ajuns exact la punctul de plecare : un fond genetic în care frecvența alelei *A* este 0,7, iar frecvența alelei *a este 0,3* . Pentru cazul general al modelului Hardy -Weinberg , vom folosi variabile în loc de valori numerice pentru frecvențele alelelor. Imaginați-vă un fond genetic în care frecvența alelei *A* este p , iar frecvența alelei a este q, astfel încât p + q = 1. Dacă selectăm aleatoriu gameți feminini și masculini din fondul genetic și îi împerechem pentru a forma un zigot, probabilitatea ca ambii să poarte alela A va fi p × p. De exemplu, frecvența genotipului AA printre zigoți va fi *p*. Probabilitatea ca gametul feminin să poarte genotipul A , iar gametul masculin să poarte genotipul a, este p x q , iar probabilitatea ca gametul feminin să poarte genotipul a, iar gametul masculin să poarte genotipul A, este q x p. Prin urmare, frecvența genotipului Aa printre zigoți va fi 2pq. În cele din urmă, probabilitatea ca ambii gameți să poarte genotipul a este q x q, ceea ce face ca frecvența genotipului aa în zigoți să fie q^2 . Prin urmare , distribuția genotipurilor printre zigoți va fi

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Acest lucru este rezumat în Figura 25.5.

Aceste calcule demonstrează cele două predicții principale ale legii Hardy-Weinberg : (1) frecvențele alele ale populației noastre nu se modifică de la o generație la alta și (2) frecvențele genotipice după o generație de împerechere aleatorie pot fi prezise din frecvențele alele. Cu alte cuvinte, această populație nu se modifică și nu evoluează în raport cu locusul pe care l-am examinat. Rețineți, totuși , că

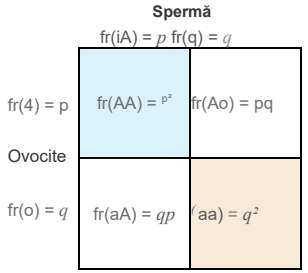


FIGURA 25.5 Descrierea generală a frecvențelor alelelor și genotipurilor cu ipotezele Hardy-Weinberg. Frecvența alelei *A* este *p* , iar frecvența alelei *a* este *q*. După împerechere, cele trei genotipuri *AA, Aa și aa* vor avea frecvențe p^2 , *2pq* și respectiv q^2 . Ipoteze pe care se bazează populația teoretică descrisă de legea Hardy-Weinberg :

1. Toți indivizii din toate genotipurile au rate de supraviețuire egale și succes reproductiv egal - adică nu există selecție.
2. Nu se creează nicio alelă nouă și nici nu se convertește vreo alelă prin mutație.
3. Nu există nicio migrație a indivizilor către sau dinspre acea populație.
4. Populația este infinit de mare, ceea ce, în termeni practici, înseamnă că este suficient de mare pentru a ignora erorile de eșantionare și alte efecte aleatorii .
5. Indivizii care alcătuiesc populația sunt împerecheați aleatoriu.

Aceste presupuneri sunt cele care fac legea Hardy-Weinberg atât de utilă în cercetarea geneticii populațiilor. Prin specificarea condițiilor în care o populație nu poate evolua, putem folosi legea Hardy-Weinberg pentru a identifica forțele care acționează în lumea reală și care determină variația frecvențelor alelelor. Cu alte cuvinte, menținând constante anumite condiții, legea Hardy-Weinberg izolează forțele evoluției și ne permite să le cuantificăm. De asemenea , poate fi utilizată pentru a identifica „gene neutre" din cadrul fondului genetic al unei populații - gene asupra cărora nu acționează forțele evoluției .

Legea Hardy-Weinberg are consecințe suplimentare importante:

1. Aceasta arată că trăsăturile dominante nu se dezvoltă neapărat de la o generație la alta.
2. Aceasta demonstrează că variabilitatea genetică poate fi perfect menținută într-o populație, deoarece frecvențele alelelor, odată stabilite în cadrul unei populații ideale, rămân nealterate.
3. Folosind ipotezele Hardy-Weinberg , dacă cunoaștem frecvența unui singur genotip, putem calcula frecvențele tuturor celorlalte genotipuri la acel locus din cadrul populației . Acest lucru este util în special în genetica umană , deoarece putem calcula frecvența purtătorilor heterozigoți ai tulburărilor genetice recesive , chiar dacă cunoaștem doar frecvența indivizilor afectați .

ACUM REZOLVĂ ASTA

25.1 Capacitatea de a detecta gustul compusului PTC este controlată de o alelă dominantă *T*, astfel încât indivizii homozigoți pentru alela recesivă *t* Nu pot detecta gustul PTC. Într -o clasă de genetică cu 1 din 25 de elevi, 88 pot detecta valoarea PTC, iar 37 nu. Calculați frecvența alelelor *Ty și t.* din această populație și frecvența genotipurilor corespunzătoare.

■ SUGESTIE: *Această problemă necesită înțelegerea modului de determinare a frecvențelor alelelor și genotipurilor folosind legea Hardy-Weinberg. Cheia rezolvării acesteia constă în determinarea frecvenței alelelor (poq) care ar trebui estimată prima atunci când genotipurile homozigote dominante și heterozigote au același fenotip.*

25.3 Legea Hardy-Weinberg poate fi aplicată populațiilor umane

Pentru a ilustra modul în care se măsoară frecvențele alelelor într- o populație reală, să luăm în considerare o genă care influențează susceptibilitatea la infecția cu HIV-1, virusul responsabil pentru SIDA (sindromul imunodeficienței dobândite). Un număr mic de indivizi care fac alegeri cu risc ridicat (cum ar fi întreținerea de relații sexuale neprotejate cu parteneri seropozitivi) nu se infectează . Unii dintre acești indivizi sunt homozigoți pentru o alelă mutantă a unei gene numite *CCR5.*

Calculul frecvenței alelelor

Gena *CCR5* (Figura 25.6) codifică o proteină numită receptorul chemokinei CC5 , adesea abreviat ca CCR5. Chemokinele sunt molecule de semnalizare

FIGURA 25.6 Organización del gen *CCR5* en la región 3p21.3. El gen contiene cuatro exones y tres intrones. La flecha muestra la ubicación de la deleción de 32 pares de bares en el exón 4 que confiere resistencia a la infección VIH-1.

asociate cu sistemul imunitar. Proteina CCR5 este, de asemenea, un receptor pentru tulpinile HIV-1, permițând virusului să pătrundă în celule. Alela mutantă a genei CCR5 conține o deleție de 32 de perechi de baze într-o regiune codificatoare, ceea ce face ca proteina codificată să fie mai scurtă și nefuncțională. La indivizii homozigoți pentru această mutație, HIV-1 nu poate pătrunde în celulele lor. Alela normală se numește CO5i (numită și ï), iar alela mutantă se numește CCR5-A32 (numită și A32).

Persoanele homozigote A32/A32 sunt rezistente la infecția cu HIV-1; persoanele heterozigote (1/A32) sunt susceptibile la infecția cu HIV-1, dar progresează mai lent spre SIDA. Tabelul 25.1 prezintă un rezumat al posibilelor genotipuri pentru *locusul CCR5 și* al fenotipurilor asociate cu fiecare.

Genotipuri și fenotipuri H ***CCR5***

Genotip	Fenotip
1/1	Sensibil la tulpinile de HIV-1 cu transmitere sexuală.
J/32	Sensibili, dar pot dezvolta lent SIDA.
32/A32	Rezistent la majoritatea tulpinilor de HIV-1 cu transmitere sexuală.

Descoperirea alelei CCR5-A32 ridică două întrebări importante: ce populații umane poartă alela A32 și cât de frecventă este aceasta? Pentru a răspunde la aceste întrebări, echipe de cercetători au prelevat probe de la indivizi din diverse populații. Genotipurile au fost determinate prin analiza directă a ADN-ului (Figura 25.7)*. Într-o populație, 79 de indivizi aveau genotipul 1/1, 20

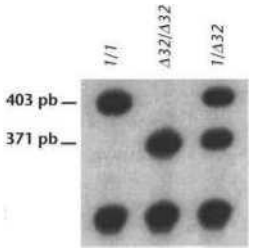


FIGURA 25.7 Variația alelică a genei CCR5. Michel Samson și colegii săi au utilizat PCR pentru a amplifica o porțiune a genei CCR5 care conține situsul de deleție de 32 de perechi de baze, au tăiat fragmentele de ADN rezultate folosind o enzimă de restricție și au analizat fragmentele prin electroforeză în gel. Fiecare bandă dezvăluie genotipul unui singur individ. Alela *1* produce un fragment de 332 pb și un fragment de 403 pb. Alela *0,32* produce un fragment de 332 pb și un fragment de 371 pb. Heterozigoții produc trei benzi.

Acestea erau I/A32 și ï era A32/A32. Această populație avea 158 de copii ale alelei CCR5I purtate de indivizii 1/1 plus 20 de copii purtate de indivizii 1/A32, rezultând un total de 178. Frecvența alelei CCR5I în populația eșantion a fost, prin urmare, 178/200 = 0,89 = 89%. Copii ale alelei CCR5-A32 au fost purtate de 20 de indivizi 1/A32 plus 2 copii purtate de individul A32/A32, rezultând un total de 22. Frecvența alelei CCR5-A32 a fost, prin urmare, 22/200 - 0,11 = 11 % . Rețineți că p + q - 1, ceea ce confirmă că am luat în considerare întregul fond genetic . Tabelul 25*2 prezintă două metode pentru calcularea frecvențelor alelelor 1 și A32 în populația eșantion *

TABLA 25.2 Métodos para determinar las frecuencias alélicas a partir de los datos sobre los genotipos

(a) Recuenta de alelas

	Genotipo			
	1/1	*Í/Á32*	*Á32/Á32*	Total
Número de individuos	*79*	20	1	100
Número de alelos *1*	158	20	0	178
Número de alelos A32	0	20	*2*	*22*
Número total de alelos	158	40	*2*	200

Frecuencia de CCR5J en la muestra: 178/200 = 0,89 — 89%

Frecuencia de CCR5-A32 en la muestra: 22/200 — 0,11 — 11%

(h) A partir de lu frecuencias gehptípicu

	Genotipo			
	1/1	*1/Á32*	A32/A32	Total
Número de individuos	*79*	20	**1**	100
Frecuencia genotipica	79/100 = 0,79	20/100 = 0,20	1/100 - 0,01	1,00

Frecuencia de *CCR51* en la muestra: 0,79 — (0,5) 0,20 = 0,89 = 89%

Frecuencia de CCR5-A32 en la muestra: (0,5) 0,20 ■+ 0,01 — 0,11 — 11%

Ne putem aștepta ca *alela CCR5-A32 să* crească în populațiile umane unde este în prezent rară? Dacă aceste populații ar îndeplini ipotezele legii Hardy-Weinberg, atunci frecvența alelei A32 nu s-ar schimba. Cu toate acestea, așa cum vom vedea în secțiunile ulterioare ale acestui capitol, atunci când ipotezele legii Hardy-Weinberg nu sunt îndeplinite - din cauza selecției naturale, mutației, migrației sau derivei genetice - frecvențele alelelor dintr-o populație se pot schimba de la o generație la alta. Legea Hardy-Weinberg le spune geneticienilor unde să caute pentru a găsi cauzele evoluției în cadrul populațiilor.

Verificarea echilibrului Hardy-Weinberg

O modalitate de a determina dacă una (sau mai multe) dintre ipotezele Hardy-Weinberg sunt încălcate într-o anumită populație este de a verifica dacă genotipurile populației sunt în echilibru. Pentru a face acest lucru, determinăm mai întâi frecvențele genotipurilor, fie direct din fenotipuri (dacă heterozigoții sunt recunoscuți), fie analizând proteinele sau secvențele de ADN. Apoi calculăm frecvențele alelelor din frecvențele genotipurilor, așa cum se arată mai sus. În cele din urmă, folosim frecvențele alelelor din generația parentală pentru a prezice frecvențele genotipurilor urmașilor. Conform legii Hardy-Weinberg, frecvențele genotipurilor prezise trebuie să satisfacă relația $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Dacă nu o îndeplinesc, atunci una sau mai multe dintre ipoteze nu sunt valabile pentru populația în cauză.

Pentru a ilustra acest lucru, începem cu o populație de 283 de indivizi, dintre care 223 au genotipul *1/1;* 57 au genotipul *1/A32* ; și 3 au genotipul A32/A32. Aceste numere reprezintă frecvențele genotipice de 223/283 = 0,788, 57/283 = 0,201 și respectiv 3/283 = 0,011. Din aceste frecvențe genotipice, calculăm frecvența alelelor *CCR5-1,* obținând 0,89, și frecvența alelelor *CCR5-S32* , considerând-o 0,11. Pe baza acestor frecvențe alele, putem utiliza legea Hardy-Weinberg pentru a determina dacă această populație este în echilibru. Frecvențele alelelor prezic următoarele frecvențe genotipice:

Frecvența așteptată a genotipului

$$l/l = p^2 = (0,89)^2 = 0,792$$

Frecvența așteptată a genotipului

$$1/A32 = 2pij = 2(0,89)(0,1\,1) = 0,196$$

Frecvența așteptată a genotipului

$$A32/A32 = q^2 = (0,11)^2 = 0,012$$

Aceste frecvențe așteptate sunt aproape identice cu frecvențele observate . Testarea noastră asupra acestei populații nu a reușit să ofere dovezi că ipotezele Hardy - Weinberg sunt încălcate . Această concluzie este confirmată de o analiză / 2 *(vezi* Capitolul 3). Valoarea y^2 În acest caz este foarte mic : 0,00023. Pentru a respinge ipoteza nulă chiar și cu cel mai generos nivel de acceptare , $p = 0,05$, valoarea ■/ ar trebui să fie 3,84. (Într -o verificare a echilibrului Hardy-Weinberg , gradele de libertate sunt date de formula $k = 1 - m$, unde k este numărul de genotipuri și m este numărul de frecvențe alele independente estimate din date . Aici, $k = 3$ și $m = 1$, deoarece calcularea unei singure frecvențe alele ne permite să o determinăm pe cealaltă pur și simplu prin scădere. Prin urmare, avem 3 — 1 — 1 = 1 grad de libertate.

Calculul frecvențelor pentru alele multiple în populațiile Hardy-Weinberg

Este destul de comun să găsim mai multe alele ale aceleiași gene într-o populație. Un exemplu ar fi grupa sanguină ABO la oameni (despre care am discutat în Capitolul 4). Reamintim că locusul *I* (izoaglutinina) are trei alele I^A, *r* și í, ceea ce oferă șase combinații genotipice posibile *(DE LA I LA EU A, eu p i, eu i , EU A I e , I A i , I B i).* Rețineți că în acest caz, I^A e I^B Sunt alele codominante și ambele domină asupra lui i . Rezultatul este că indivizii homozigoți $I^{PÂNĂ LA} I^A$ și heterozigoți de la $I^{LA} I$ Sunt fenotipic identici, la fel ca indivizii $I^{și}$ $SUNT^{ERI} t$, *deci* putem distinge doar patru combinații fenotipice.

Prin adăugarea unei alte variabile la ecuația Hardy-Weinberg , putem calcula frecvențele alelelor și genotipurilor pentru această situație care implică trei alele . Fie p , *q* și *r* frecvențele alelelor I^A / ^{B} ei , respectiv . Rețineți că, deoarece există trei alele

$$p+q+r=1$$

Cu ipotezele Hardy-Weinberg , frecvențele genotipurilor vor fi date de formula

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + /+ 2pq + 2pr + 2pq = 1$$

Dacă cunoaștem frecvențele grupelor sanguine dintr -o populație, putem estima frecvențele celor trei alele ale sistemului ABO . De exemplu, într-o populație eșantionată , au fost observate următoarele frecvențe ale grupelor sanguine : A = 0,53, B = 0,13, O = 0,26. Deoarece

alela *i* Dacă este recesiv, frecvența grupei sanguine O în cadrul populației va fi egală cu proporția genotipului recesiv r . Prin urmare,

¿ = 0,26

r= v^26

r = 0,51

Folosind *r* , putem calcula frecvențele alelelor *pentru* alelele de *LA I^A B*. Alela *I^A* este prezentă în două genotipuri , *I^A I^A* și 7*i. Frecvența genotipului *I* a *'A ESTE* reprezentată de *p2* , iar cea a genotipului 7*1 de *2pr*. Prin urmare, frecvența combinată a grupei sanguine A și a grupei sanguine O va fi dată de

pagina ^1 + *2pr* ^+ *r*^2 = 0,53 + 0,26

Dacă factorizăm partea stângă a ecuației și adunăm termenii din partea dreaptă

(p + r) ^2 = 0,79

p + r = y/0,79 p = 0,89 - r *p* = 0,89 - 0,51 = 0,38

După ce am calculat *p* și r, care sunt frecvențele alelelor *IA* ^si I , putem acum calcula frecvența alelei 1®:

p + q + r = 1

q=lpr

= I - 0,38 - 0,51

= 0,11

Frecvențele fenotipice și genotipice ale acestei populații sunt rezumate în Tabelul 25.3.

Calculul frecvențelor alele pentru trăsăturile legate de X

Legea Hardy -Weinberg poate fi utilizată pentru a calcula frecvențele alelelor și genotipurilor pentru trăsăturile legate de X , cu condiția să ne amintim că într -un sistem de determinare a sexului XY , sexul homogametic (XX) va avea două copii ale unei alele legate de X , în timp ce sexul heterogametic (XY) va avea o singură copie. Prin urmare, pentru mamiferele (inclusiv oamenii) la care femela este XX și masculul este XY, frecvența alelei legate de X în fondul genetic și frecvența masculilor care exprimă trăsătura legată de X vor coincide. Acest lucru se datorează faptului că fiecare - mascul are un singur cromozom X, iar probabilitatea ca orice mascul să primească un cromozom X cu alela în cauză trebuie să fie egală cu frecvența alelelor. Probabilitatea ca orice femelă să aibă alela în cauză pe ambii cromozomi X va fi q² · unde q este frecvența alelelor.

Pentru a ilustra acest lucru în cazul unei trăsături recesive legate de cromozomul X, să luăm în considerare exemplul daltonismului , care împiedică discriminarea culorilor roșu și verde și afectează 8% dintre bărbați. Prin urmare, frecvența alelei care provoacă acest - daltonism este de 0,08; cu alte cuvinte, 8% din cromozomii X îl poartă. Restul de 92% din cromozomii X poartă alela dominantă care permite vederea normală a roșului și verdelui. Dacă definim *p* ca frecvența alelei normale și q ca frecvența alelei care provoacă daltonismul, atunci *p* = 0,92 și q = 0,08. Frecvența femeilor care vor suferi de acest daltonism (cu doi cromozomi X afectați) va fi q = (0,08) ^2 = 0,0064, iar frecvența femeilor purtătoare (care au un - cromozom X normal și unul afectat) va fi 2pq = 2(0,08)(0,92) = 0,147. Adică, 14,7% dintre femei poartă alela care determină incapacitatea de a distinge culorile roșu și verde și o pot transmite copiilor lor, chiar dacă au o vedere normală a culorilor .

O consecință importantă a diferenței în frecvența alelelor dintre gameții masculini și feminini pentru genele legate de cromozomul X este că, pentru o alelă recesivă rară , trăsătura va fi exprimată mult mai frecvent la indivizii XY decât la indivizii XX . Astfel, de exemplu, boli precum hemofilia și distrofia musculară Duchenne - (DMD) la om , ambele cauzate de mutații recesive pe cromozomul X, sunt mult mai frecvente la băieți, care trebuie să moștenească doar o copie a alelei mutate pentru a dezvolta boala . Fetele care moștenesc doi cromozomi X afectați

TABLA 25.3

1 Cálculo de las frecuencias genotipicas para múltiples alelos en una población de Hardy-Weinberg, 1 en la que las frecuencias alélicas son *I^A* = 0,38, *I^B* = 0,11 e *i* = 0,51

Genotipo	Frecuencia genotipica	Fenotipo	Frecuencia fenotípica
A*	$p^2 = (0,38)^2$-0,14	A	0,53
rt	***2pr =*** 2(0,38)(0,51) = 0,39		
ff	$q^2 = (0,11)^2 = 0,01$	B	0,12
fi	***2qr -*** 2(0,11)(0,51) = 0,11		
ff	***2pr =*** 2(0,38)(0,11) = 0,084	AB	0,08
ii	? = $(0,51)^2 = 0,26$	O	0,26

vor dezvolta, de asemenea, boala ; cu toate acestea, deoarece este o alelă rară, probabilitatea ca acest lucru să se întâmple este mică.

Calculul frecvenței heterozigoților

- o altă aplicație, legea Hardy-Weinberg ne permite să estimăm frecvența heterozigoților într-o populație. Frecvența unei trăsături recesive poate fi de obicei determinată prin numărarea indivizilor corespunzători dintr -un eșantion al populației . Cu aceste informații și legea Hardy-Weinberg , putem apoi calcula frecvențele alele și fenotipice.

Fibroza chistică, o trăsătură autosomal recesivă, are o incidență de aproximativ 1/2500 = 0,0004 la persoanele de origine nord-europeană. Persoanele cu fibroză chistică pot fi ușor distinse de restul populației prin simptome precum transpirație excesiv de sărată, mucus gros în plămâni și susceptibilitate la infecții bacteriene. Deoarece este o trăsătură recesivă, indivizii cu fibroză chistică trebuie să fie homozigoți. Frecvența sa în cadrul unei populații este reprezentată de q^2 , presupunând împerecherea aleatorie în generația anterioară. Prin urmare, frecvența alelei recesive va fi

$$q = Tq^5 = 5/0,0004 = 0,02$$

Deoarece $p + q = 1$, atunci frecvența lui *p este*

$$p = 1 - q = 1 - 0,02 = 0,98$$

În ecuația Hardy - Weinberg , frecvența heterozigoților este 2pq . Prin urmare,

$$2pq = 2(0,98)\,(0,02)$$
$$= 0,04 \text{ sau } 4 \text{ procente , sau } 1/25$$

Heterozigoții pentru fibroza chistică sunt destul de frecvenți în populație (aproximativ 1/25, sau 4 %), chiar dacă incidența homozigoților recesivi este de doar 1/2500, ceea ce este echivalent cu 0,04 %.

ACUM REZOLVĂ ASTA

25.2 Dacă fenotipul albino apare la 1/10.000 de indivizi dintr-o populație aflată la echilibru și albinismul este cauzat de o alelă recesivă autozomală *a*, calculați frecvența (a) alelei mutante recesive, (b) alelei dominante normale; (c) heterozigoților din populație și (d) perechilor dintre heterozigoți.

■ **SUGESTIE:** *Această problemă necesită înțelegerea modului de utilizare a legii Hardy-Weinberg pentru a calcula frecvențele alelelor și frecvențele heterozigoților. Cheia rezolvării acesteia constă în rezolvarea problemei în ordinea prezentată.* Aceste tipuri de calcule sunt estimări, deoarece populația nu satisface neapărat toate ipotezele Hardy-Weinberg.

25,4

Selecția naturală

Este una dintre principalele forțe care modifică frecvența alelelor

■

Pentru a înțelege evoluția, trebuie să înțelegem forțele care transformă fondul genetic al populațiilor și care pot duce la formarea de noi specii. Printre principalele mecanisme de transformare a populațiilor se numără selecția naturală , descoperită independent de Alfred Russel Wallace și Charles Darwin. Conceptul Wallace - Darwin de selecție naturală poate fi rezumat după cum urmează :

1. Indivizii unei specii prezintă variații în fenotipul lor - de exemplu, diferențe de mărime, agilitate, colorație, apărare împotriva inamicilor, capacitatea de a obține hrană, ritualuri de curtare și perioade de înflorire.
2. Multe dintre aceste variații, chiar și cele mici și aparent nesemnificative , sunt ereditare și se transmit urmașilor .
3. Organismele tind să se reproducă exponențial . Se produc mai mulți urmași decât pot supraviețui . Acest lucru duce la o luptă pentru supraviețuire între membrii unei specii , deoarece aceștia concurează cu alți membri pentru resurse limitate . De asemenea , urmașii trebuie să evite prădătorii , iar la speciile care se reproduc sexuat, adulții trebuie să concureze pentru a-și găsi parteneri.
4. În lupta pentru supraviețuire, indivizii cu anumite fenotipuri vor avea mai mult succes decât alții, permițându-le celor dintâi să aibă rate de supraviețuire și reproducere mai mari .

Ca o consecință a selecției naturale, populațiile și speciile se schimbă. Fenotipurile care oferă o capacitate mai mare de supraviețuire și reproducere devin mai frecvente , în timp ce fenotipurile care oferă perspective mai slabe de supraviețuire și reproducere pot dispărea . În anumite condiții, populațiile care odinioară erau capabile să se încrucișeze pot pierde această capacitate, segregându- și astfel adaptările respective într- o serie de nișe exclusive . Dacă selecția continuă , aceasta poate duce la apariția unor noi specii.

Detectarea selecției naturale în cadrul populațiilor

Rețineți că măsurarea frecvențelor alelelor și genotipurilor folosind legea Hardy-Weinberg se bazează pe anumite presupuneri despre ceea ce constituie o populație ideală: o dimensiune mare a populației, lipsa migrației, prezența împerecherii aleatorii, absența selecției și mutației și rate egale de supraviețuire a urmașilor .

Totuși, dacă nu toate genotipurile au rate de supraviețuire egale sau dacă nu toate genotipurile lasă același număr de urmași, atunci frecvențele alelelor pot varia de la o generație la alta. Pentru a vedea de ce, să ne imaginăm o populație de 100 de indivizi în care frecvența alelei A este 0,5, iar cea a alelei *a* este, de asemenea, 0,5. Presupunând că generația anterioară s-a împerecheat aleatoriu, constatăm că frecvențele genotipurilor din generația actuală vor fi $(0,5)^2 = 0,25$ pentru *AA,* $2(0,5)(0,5) = 0,5$ pentru *Aa* și $(0,5)^2 = 0,25$ pentru *aa.* Deoarece populația noastră are 100 de indivizi, vom avea 25 de indivizi AA, 50 de indivizi *Aa* și 25 *de indivizi aa.* Acum să presupunem că indivizii cu genotipuri diferite au rate de supraviețuire diferite: toți cei 25 de indivizi AA supraviețuiesc pentru a se reproduce, 90% (adică 45) dintre indivizii *Aa* supraviețuiesc pentru a se reproduce și 80 % (adică 20) dintre indivizii *aa* supraviețuiesc pentru a se reproduce. Când supraviețuitorii se reproduc, fiecare va contribui cu doi gameți la noul fond genetic , rezultând 2(25) + 2(45) + 2(20) = 180 de gameți. Care vor fi frecvențele celor două alele în populația supraviețuitoare? Avem 50 de gameți A de la indivizi AA , plus 45 de gameți A de la indivizi Aa , deci frecvența alelei A va fi (50 + 45)7180 = 0,53. Avem 45 *de gameți* a de la indivizi Aa , plus 40 de gameți *a* . a indivizilor *aa,* deci frecvența lui ale lo *a va fi* (45 + 40)7180 = 0,47.

Aceste frecvențe diferă de cele cu care am început. Frecvența alelei A a crescut, iar frecvența alelei *a* a scăzut. O diferență între indivizi în ceea ce privește rata de supraviețuire sau de reproducere (sau ambele) este un exemplu de ceea ce se numește selecție naturală . Selecția naturală este principala forță care determină variația frecvențelor alelelor în cadrul populațiilor mari și este unul dintre cei mai importanți agenți ai schimbării evolutive .

Fitness și selecție biologică

Selecția are loc ori de câte ori indivizii cu un anumit genotip se bucură de un avantaj relativ în supraviețuire și reproducere în comparație cu alte genotipuri. Cu toate acestea, selecția poate varia de la mai puțin de 1% la 100%. În exemplul ipotetic de mai sus, a existat o presiune selectivă puternică. O presiune selectivă slabă ar putea implica pur și simplu o diferență de o fracțiune de un procent în ratele de supraviețuire ale diferitelor genotipuri . Aceste avantaje în supraviețuire și reproducere se traduc în cele din urmă într - o contribuție genetică crescută la generațiile viitoare . Contribuția genetică a unui individ la generațiile viitoare se numește fitness biologic . Spunem că genotipurile asociate cu rate ridicate de succes reproductiv au o fitness biologic ridicată, în timp ce genotipurile asociate cu succes reproductiv scăzut au o fitness biologic scăzută .

Analiza Hardy-Weinberg ne permite să examinăm adaptabilitatea biologică. Prin convenție, geneticienii populațiilor folosesc litera w pentru a reprezenta adaptabilitatea biologică. Prin urmare , reprezintă adaptabilitatea biologică relativă a genotipului AA, reprezintă adaptabilitatea biologică relativă a genotipului *Aa* și reprezintă adaptabilitatea biologică relativă a genotipului *aa.* Atribuiți valorile w_{AA} — 1, *cu* $_{Aa}$ = 0,9 și y = 0,8 ar însemna, de exemplu, că toți indivizii AA supraviețuiesc , că 90 % dintre indivizii *Aa* supraviețuiesc și că 80 % dintre indivizi *aa* Ei supraviețuiesc, ca și în cazul ipotetic anterior .

Să luăm în considerare presiunea selectivă împotriva alelelor dăunătoare. Valorile de fitness biologic wAA = *1* , $_{=1}$ și = 0 descriu o situație în care *a* este o alelă letală homozigotă. Deoarece indivizii recesivi homozigoți mor fără *a* lăsa urmași, frecvența alelei a va scădea. Modificarea frecvenței alelei *a* este descrisă de ecuația unde $q = _g$ este *frecvența* alelei a În generația $_g$, q0 este frecvența lui *a* în generația zero , iar g este numărul de generații care au trecut.

Figura 25.8 arată ce se întâmplă cu alela letală recesivă care are o frecvență inițială de 0,5. Inițial , datorită procentului mare de genotipuri *aa* , frecvența alelei *a* Scade *rapid* . Frecvența unei Se înjumătățește în doar două generații. Până la a șasea generație, frecvența scade din nou la jumătate . Cu toate acestea , în acest moment, majoritatea alelelor a sunt purtate de heterozigoți. Deoarece *a este recesiv,* acești heterozigoți nu vor fi eliminați prin selecție. *În* consecință , pe măsură ce trece timpul , frecvența alelei *a* scade . Scade din ce în ce mai lent. Atâta timp cât indivizii heterozigoți continuă să se împerecheze , este dificil pentru selecție să elimine complet alela recesivă dintr - o populație.

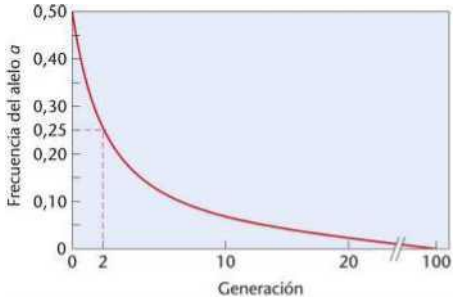


FIGURA 25.8 Modificarea frecvenței unei alele recesive letale *a*. Frecvența alelei *a* scade la jumătate în două generații și scade din nou la jumătate în a șasea generație. Reducerile ulterioare au loc într-un ritm lent, deoarece majoritatea alelelor a *sunt* purtate de heterozigoți.

Figura 25.9 prezintă rezultatul aplicării diferitelor grade de selecție împotriva unei alele recesive neletale, *a*. În acest caz, intensitatea selecției variază de la un nivel puternic (curba roșie) la un nivel slab (curba albastră), fiind furnizate și valori intermediare (curbe galbene, violete și verzi). În fiecare exemplu, frecvența alelei dăunătoare *a* Începe de la 0,99 și scade în timp . Cu toate acestea, rata de reducere depinde puternic de intensitatea selecției . Când selecția este puternică și doar 90% dintre heterozigoți și 80 % dintre homozigoți *aa supraviețuiesc* (curba roșie *)* , frecvența alelei a Aceasta scade de la 0,99 la mai puțin de 0,01 în aproximativ 85 de generații. Cu toate acestea, atunci când selecția este slabă și 99,8 % dintre heterozigoți și 99,6% dintre homozigoți aa supraviețuiesc (curba albastră), este nevoie de 1.000 de generații pentru ca frecvența alelei a să scadă de la 0,99 la 0,93. Putem trage două concluzii importante din acest exemplu. În primul rând, atunci când selecția este slabă și 99,8% dintre heterozigoți și 99,6% dintre homozigoți aa supraviețuiesc (*curba* albastră), este nevoie de 1.000 de generații pentru ca frecvența alelei *a să* scadă de la 0,99 la 0,93. Putem trage două concluzii importante din acest exemplu .

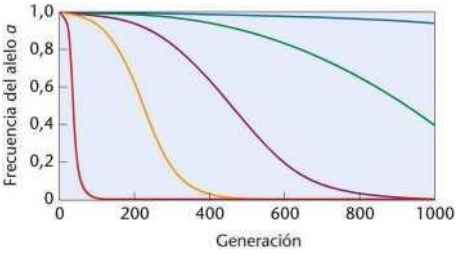


FIGURA 25.9 Efectul selecției asupra frecvenței alelelor. Rata la care o alelă dăunătoare este eliminată dintr-o populație depinde puternic de intensitatea selecției.

De-a lungul a mii de generații, chiar și o selecție slabă poate provoca modificări substanțiale ale frecvențelor alele ; deoarece evoluția are loc de obicei pe parcursul unui număr mare de generații, selecția este o forță motrice puternică a schimbării evolutive . În al doilea rând , pentru ca selecția să producă modificări rapide ale frecvențelor alele , diferențele de adaptare dintre diferitele genotipuri trebuie să fie mari .

Modul în care selecția afectează frecvențele alelelor ne permite să facem anumite deducții despre alela CCR5- *&32* despre care am discutat anterior. Întrucât indivizii cu genotipul A32 /A32 sunt - rezistenți la majoritatea tulpinilor de HIV-1 cu transmitere sexuală, în timp ce genotipurile 1/1 și U *și* 32 *sunt* sensibile , este rezonabil să ne așteptăm ca SIDA să acționeze ca o forță selectivă , determinând creșterea frecvenței alelei A32 în timp . Este cu siguranță probabil să se întâmple acest lucru , dar creșterea frecvenței va tinde să fie lentă în termeni umani. De fapt, ar fi nevoie de aproximativ 100 de generații (aproximativ 2.000 de ani) pentru ca frecvența alelei A32 să ajungă la 0,11. Cu alte cuvinte, este puțin probabil ca frecvența alelei A32 să se schimbe prea mult în generațiile următoare în majoritatea populațiilor în care există în prezent .

Există mai multe tipuri de selecție

Fenotipul este rezultatul influenței combinate a genotipului individului în multe loci diferite și al efectelor mediului. Selecția acestor trăsături complexe poate fi clasificată în trei tipuri distincte : (1) direcțională , (2) stabilizatoare sau (3) disruptivă .

În selecția direcțională sau pozitivă (Figura 25.10), fenotipurile situate la un capăt al spectrului experimentează

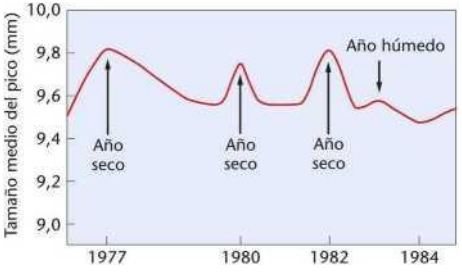


FIGURA 25.10 Dimensiunea ciocului la cinteze crește în anii secetoși din cauza unei presiuni selective puternice. Între perioadele de secetă, presiunea selectivă în favoarea ciocurilor mari nu este la fel de puternică, iar păsările cu ciocuri mai mici supraviețuiesc și se reproduc, crescând numărul de păsări cu ciocuri mai scurte.

Presiunea selectivă, fie pro, fie contra, rezultă de obicei din schimbările de mediu. Un exemplu atent documentat provine din cercetările efectuate de Peter și Rosemary Grant și colegii lor, care au studiat cinteza medie de sol *(Geospiza fortis)* de pe insula Daphne Major din Insulele Galapagos. Dimensiunea ciocului acestor păsări variază enorm. De exemplu, în 1976, unele păsări din populație aveau ciocuri mai scurte de 7 mm, în timp ce altele aveau ciocuri mai lungi de 12 mm. În 1977, o secetă severă a ucis aproape 80% dintre cinteze. Păsările cu cioc mai mare au avut o rată de supraviețuire mai mare decât cele cu cioc mai mic, deoarece, atunci când hrana devenea insuficientă, păsările cu cioc mai mare au putut mânca o varietate mai mare de semințe. Când seceta s-a încheiat în 1978, urmașii supraviețuitorilor au moștenit ciocurile mari ale părinților lor. Între 1976 și 1978, lungimea ciocului cintezei mijlocii din populația Daphne Major a crescut cu puțin peste 0,5 mm, deplasând dimensiunea ciocului către una dintre extremele fenotipice.

Selecția stabilizatoare tinde să favorizeze fenotipurile intermediare, exercitând o presiune selectivă împotriva ambelor extreme. În timp, aceasta reduce varianța fenotipică a populației fără a deplasa semnificativ media. Una dintre cele mai clare demonstrații în acest sens este prezentată într-un studiu privind greutatea la naștere și supraviețuirea la 13.730 de sugari născuți pe o perioadă de 11 ani . Figura 25.11 prezintă distribuția greutății la naștere și procentul de mortalitate la vârsta de patru săptămâni. Mortalitatea infantilă crește de ambele părți ale greutății optime , care este de 3,4 kilograme. Selecția stabilizatoare acționează pentru a menține o populație adaptată la mediul său actual.

Selecția disruptivă este un caz în care selecția acționează împotriva fenotipurilor intermediare și în favoarea

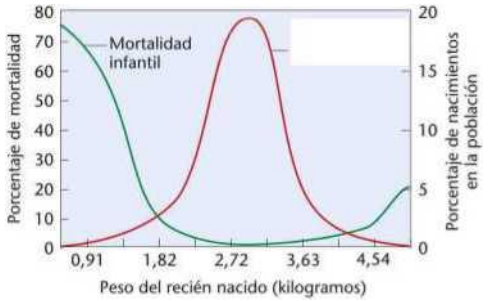


FIGURA 25.11 Relația dintre greutatea nou-născuților și rata mortalității la specia umană.

Ambele fenotipuri extreme. Acest lucru poate fi considerat opusul stabilizării selecției, deoarece există o presiune selectivă împotriva tipurilor intermediare. Acest lucru va determina populația să prezinte o distribuție bimodală din ce în ce mai mare pentru trăsătura în cauză, așa cum putem vedea în Figura 25.12. Într-un set de experimente care utilizează Drosophila , după mai multe generații de selecție artificială disruptivă bazată pe numărul de sete, în care doar mușchii cu un număr mare sau mic de sete au fost lăsate să se reproducă, majoritatea mușchilor au putut fi ușor atribuite în două categorii extreme cu un număr mare și respectiv mic de sete. În populațiile naturale, o astfel de situație poate apărea dacă populația trăiește într-un mediu eterogen.

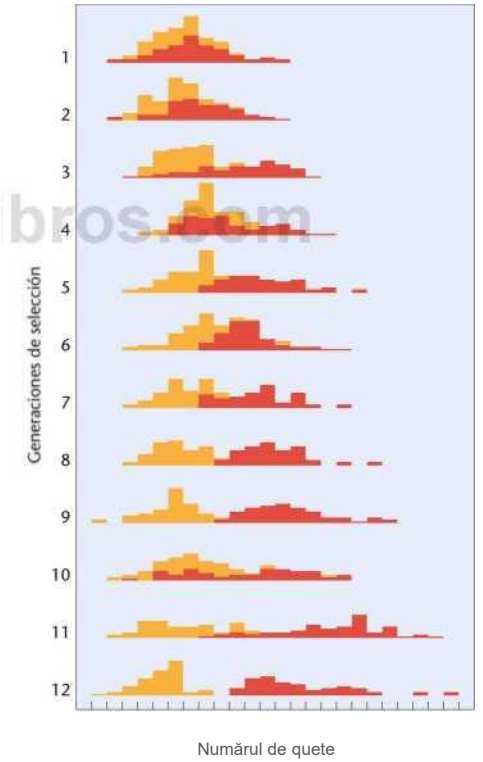


FIGURA 25.12 Efectul selecției disruptive asupra numărului de sete la *Drosophila*. *Când* au fost selectați indivizii cu cel mai mare și cel mai mic număr de sete , populația a prezentat divergență fără suprapunere în doar 12 generații

25,5

Mutația creează noi alele în cadrul unui fond genetic

În fiecare generație, fondul genetic al unei populații este reorganizat pentru a produce noi genotipuri la urmași. Enorma variație genetică prezentă în fondul genetic permite împerecherii și recombinării să producă continuu noi combinații genotipice. Dar împerecherea și recombinarea nu produc noi alele. Mutația este cea care creează noi alele în cadrul populației . Este important să se țină cont de faptul că evenimentele mutaționale apar aleatoriu - adică , fără a se ține cont de posibilele avantaje sau dezavantaje pentru organism. În această secțiune, vom analiza dacă mutația în sine este un factor semnificativ în variația frecvențelor alelelor .

Pentru a determina dacă mutația este o forță semnificativă care cauzează variații ale frecvențelor alelelor, trebuie să măsurăm rata la care apar mutațiile. Deoarece majoritatea mutațiilor sunt recesive, este dificil să se observe direct ratele de mutație la organismele diploide. Unele metode indirecte utilizează probabilitatea și statistica în programele de eșantionare la scară largă pentru a estima ratele de mutație . Cu toate acestea, pentru anumite mutații dominante, putem utiliza o metodă directă de măsurare. Pentru a asigura acuratețea, trebuie îndeplinite mai multe condiții :

1. Alela trebuie să producă un fenotip distinctiv, care poate fi diferențiat de alte fenotipuri similare produse de alele recesive.
2. Trăsătura trebuie să fie complet exprimată sau complet omniprezentă pentru a identifica indivizii mutanți.
3. Un fenotip identic nu ar trebui să poată fi niciodată produs de agenți non-genetici, cum ar fi medicamentele sau substanțele chimice.

Ratele de mutație pot fi definite ca numărul de noi alele mutante pentru un anumit număr de gameți . Să presupunem că pentru o anumită genă moștenită recesiv care mută într-o alelă dominantă, 2 din 100.000 de nașteri prezintă un fenotip mutant. În aceste cazuri, ambele seturi de părinți sunt fenotipic normale. Deoarece zigoții care au dat naștere acestor nașteri poartă fiecare câte două copii ale genei, vom fi eșantionat, în practică , 200.000 de copii ale genei (sau 200.000 de gameți). Dacă presupunem că nașterile afectate sunt heterozigote, vom fi descoperit două noi alele mutante printre cele 200.000 de alele eșantionate. Prin urmare, rata de mutație va fi de 2/200.000 sau 1/100.000, care în notație științifică se scrie IX. La om, o formă de nanism moștenit dominant , cunoscută sub numele de acondroplazie, îndeplinește cerințele noastre pentru măsurarea ratelor de mutație . Persoanele cu această afecțiune scheletică au un craniu mai mare decât în mod normal , brațe și picioare scurte și pot fi diagnosticate prin examinare cu raze X la naștere . Într -un eșantion de aproape 250.000 de nașteri , rata de mutație (p) pentru acondroplazie a fost calculată ca fiind

$$[eu = 1{,}4 \text{ X } 10^{-5} \pm {}^{0,5} \times 10^{-5}$$

Cunoscând rata de mutație , putem estima gradul în care mutația poate modifica frecvențele alelelor de la o generație la alta . Vom reprezenta alela normală prin *d și* alela de acondroplazie prin *D.* Imaginați-vă o populație de 500.000 de indivizi în care toți au genotipul dd . Frecvența inițială a lui d este 1,0 , iar frecvența inițială a *lui D* este 0. Dacă fiecare individ contribuie cu doi gameți la fondul genetic , acest fond va conține 1.000.000 de gameți , toți purtând alela d . În această colecție de alele, 1,4 din 100.000 de alele *d* mută într-o alelă *D.* Frecvența alelei *d* va fi acum (1.000.000 - 14)/ 1.000.000 = 0,999986 , iar frecvența alelei *D* va fi 14 / 1.000.000 = 0,000014. Din aceste numere, este clar că trebuie să treacă mult timp înainte ca mutația , singură , să poată provoca vreo modificare apreciabilă a frecvențelor alele ale acestei populații (Figura 25.13). Cu alte cuvinte, mutația generează noi alele, dar, prin ea însăși, nu modifică frecvențele alelelor într-o rată apreciabilă .

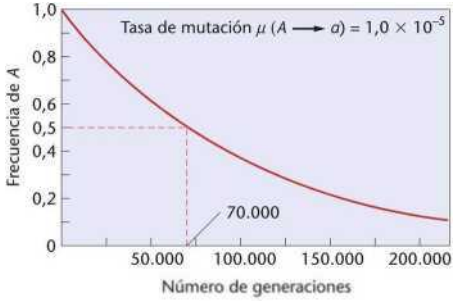


FIGURA 2S.13 Rata de substituție a unei alele doar prin mutație, presupunând o rată medie de mutație de 1,03 X 10".

25,6

Migrația și fluxul genetic pot modifica frecvențele alelelor

Uneori, o populație se împarte în populații mai mici, separate geografic. În aceste populații, diverse forțe evolutive, inclusiv selecția, migrația și deviația, pot modifica frecvențele alelelor. Migrația are loc atunci când indivizii se mută între populații. Imaginați-vă o specie în care un anumit locus are două alele, *Aya*. Există două populații ale acestei specii, una pe continent și una pe o insulă. Frecvența lui *A* pe continent este reprezentată de *p* _m , iar frecvența lui *A* pe insulă este *p_i*. Dacă există o migrație de pe continent către insulă, frecvența lui *A* în următoarea generație de insule (p_f) va fi dată de

Pr. = (I - "Op, + mp,,, unde *m* reprezintă pe cei

care au emigrat de pe continent pe insulă.

Ca exemplu al modului în care migrația poate afecta frecvența alelei *A* în următoarea generație de indivizi de pe insulă (p_1), să presupunem că $p_I = 0,4$ și $p_{,,I} = 0,6$ și că 10 % dintre părinții următoarei generații sunt imigranți de pe continent (m = 0,1). Prin urmare, în următoarea generație , frecvența alelei *A* va fi

p. = [(1 - 0,1) x 0,4] + (0,1 x 0,6)
= 0,36 + 0,06
= 0,42

În acest caz, migrația de pe continent a modificat frecvența speciei *A* pe insulă de la 0,40 la 0,42 într-o singură generație.

Aceste calcule arată că modificarea frecvenței alelelor atribuibilă migrației este proporțională cu diferențele de frecvențe alele dintre populațiile donatoare și receptoare și, de asemenea, proporțională cu rata de migrare. Dacă m este mare sau p,,, este foarte diferit de p (, atunci o modificare destul de pronunțată a frecvenței *lui* A *poate* apărea $_{intr}$ - o singură generație . Dacă migrația este singura forță care acționează pentru a varia frecvența alelelor pe insulă, atunci echilibrul va fi atins doar atunci când p $_{(}$ = *p,,,*. Aceste îndrumări pot fi adesea utilizate pentru a estima rata de migrare în acele populații în care este dificil de cuantificat. Deoarece *m* poate avea o gamă largă de valori, efectul migrației poate modifica substanțial frecvențele alelelor populațiilor, așa cum se arată pentru alela 1B a grupei sanguine ABO ^{din} Figura *25.14* .

25.7

Deriva genetică provoacă modificări aleatorii ale frecvențelor alelelor în populații mici

În populațiile mici , fluctuații aleatorii semnificative ale frecvențelor alelelor pot apărea doar din întâmplare. Gradul de fluctuație crește pe măsură ce dimensiunea populației scade , o situație cunoscută sub numele de derivă genetică . Pe lângă dimensiunea mică a populației , derivă poate apărea din cauza efectului fondator, care se întâmplă atunci când o populație provine dintr-un număr mic de indivizi al căror fond genetic poate să nu reflecte cel al populației mai mari din care au fost extrași acei fondatori. Deși populația poate crește ulterior la o dimensiune mare , genele purtate de toți membrii sunt derivate exclusiv din cele ale fondatorilor (presupunând că nu există mutații , migrații sau selecție și presupunând , de asemenea , împerechere aleatorie). Deriva poate apărea și ca o consecință a unui blocaj genetic . Blocajele apar atunci când o populație mare se confruntă cu o reducere drastică, dar temporară , a numărului său. Chiar dacă populația își revine , diversitatea sa genetică va fi fost mult redusă .

Efectele fondatorului în populațiile umane

Frecvențele alelelor anumitor populații umane ilustrează rolul derivei genetice în populațiile naturale . Indienii americani care trăiesc în sud -vestul Statelor Unite au o frecvență ridicată de albinism oculocutanat (OCA) . În tribul Navajo , care trăiește în principal în nord-estul Arizonei , albinismul apare cu o frecvență de 1 la 1.500-2.000, comparativ cu populația albă (1 la 36.000) și afro-americanii (1 la 10.000). Există patru forme diferite de OCA (OCA1-4), toate cu grade diferite de deficit de melanină la nivelul pielii, ochilor și părului . OCA2 este cauzată de mutații ale genei P , care codifică o proteină *a* membranei plasmatice . Pentru a investiga baza genetică a albinismului în tribul Navajo , cercetătorii au urmărit mutații ale genei P. În studiul lor, toți Navajo cu albinism au fost homozigoți pentru o deleție de 122,5 kb în gena *P* , care se întinde pe exonii 10-20 (Figura 25.15). Această alelă de deleție nu a fost prezentă la 34 de indivizi din alte populații de nativi americani .

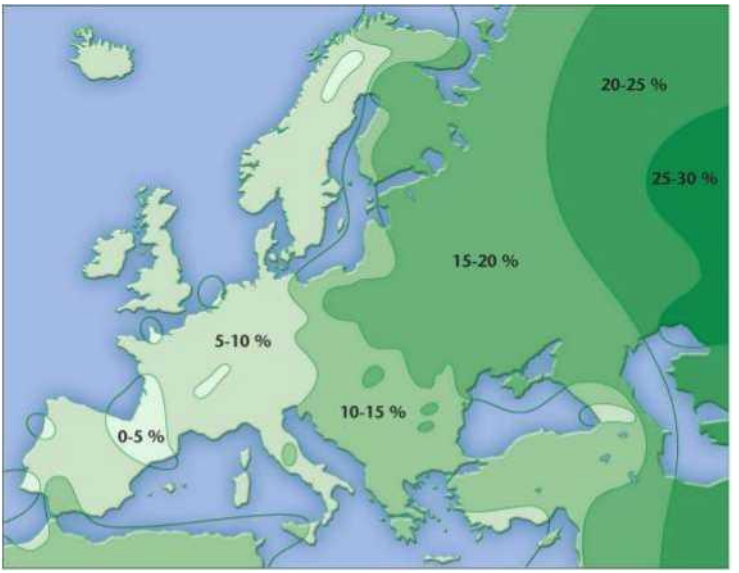


FIGURA 25.14 Migrația ca forță fundamentală în evoluție . Alela / [8] a locusului ABO este prezentă de-a lungul unui gradient est-vest. Această alelă prezintă cea mai mare frecvență în Asia Centrală și cea mai mică în nord-vestul Spaniei. Gradientul urmează valurile migrației mongole în Europa după căderea Imperiului Roman și constituie o relicvă genetică a istoriei umane.

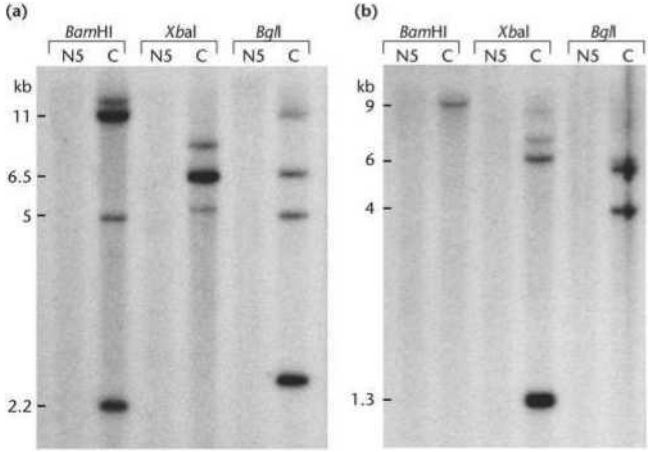


FIGURA 25.15 Produși de digestie a ADN-ului genomic de la un individ Navajo afectat de albinism (N5) și de la un individ cu pigmentare normală (C). (a) Hibridizare cu o sondă care acoperă exonii 11-15 ai genei P; nu se detectează fragmente de hibridizare în N5. (b) Hibridizare cu o sondă care acoperă exonii 15-20 ai genei P; nu se detectează fragmente de hibridizare în N5. Aceasta confirmă prezența unei deleții la indivizii afectați.

Cu amabilitatea lui Murray Brilliant, ,,O deleție de 122,5 kilobaze a genei P stă la baza prevalenței ridicate a albinismului oculocutanat de tip 2 în populația Navajo." În: American Journal Human Genetics 72:62-72, Figura 1, p. 6S. Publicat de University of Chicago Press.

Folosind un set de primeri PCR, cercetătorii au reușit să identifice indivizii homozigoți afectați și purtătorii heterozigoți (Figura 25.16) și au analizat 134 de Navajo cu pigmentare normală și 42 de membri ai tribului Apache, care este strâns înrudit cu Navajo. Pe baza acestei probe, frecvența heterozigoților în rândul Navajo a fost estimată la 4,5%. Nu s-au găsit purtători în populația Apache studiată.

Alela de deleție de 122,5 kb care cauzează OCA2 se găsește doar în populația Navajo și nu și la membrii altor triburi native americane din sud-vestul Statelor Unite, ceea ce sugerează că alela mutantă este specifică Navajo și ar fi putut apărea la un singur individ care a făcut parte dintr-un număr mic de fondatori ai populației Navajo. Folosind alte metode, cercetătorii au estimat vârsta mutației la o vechime cuprinsă între 400 și 1.000 de ani. Pentru a restrânge acest interval de date, au apelat la istoria tribului. Tradiția orală Navajo indică faptul că Navajo și Apache au devenit populații separate acum între 600 și 1.000 de ani. Întrucât deleția nu se găsește la Apache, probabil că a apărut în populația Navajo după separarea triburilor. Ținând cont de acest lucru, se estimează că deleția are o vechime cuprinsă între 400 și 1.000 de ani și probabil a apărut ca o mutație fondatoare.

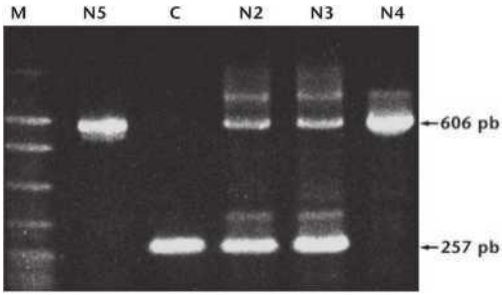


FIGURA 25.16 Analiza PCR a raselor Navajo afectate de albinism (N4 și N5) și a părinților raselor N4 (N2 și N3).
Indivizii (N4 și N), purtătorii heterozigoți (N2 și N3) și un individ homozigot normal (C) prezintă fiecare modele distincte de benzi, permițând detectarea purtătorilor heterozigoți în cadrul populației. Prima bandă afișează markerii dimensiunii moleculare (M).
Cu amabilitatea lui Murray Brilliant, «O deleție de 122,5 kilobaze a genei P stă la baza prevalenței ridicate a albinismului oculocutanat de tip 2 în populația Navajo.» Din: American Journal Human Genetics 72:62-72, Figura 3, p. 67. Publicat de University of Chicago Press

25,8

Împerecherea nealeatorie modifică frecvența fenotipică, dar nu și frecvența alelelor

Am văzut deja cum încălcările primelor patru ipoteze ale legii Hardy-Weinberg - sub forma selecției , mutației, migrației și derivei genetice - pot duce la variații ale frecvențelor alelelor . A cincea ipoteză este că membrii unei populații se împerechează aleatoriu ; cu alte cuvinte , fiecare genotip are o probabilitate egală de a se împerechea cu orice alt genotip din populație . Împerecherea nealeatorie poate determina variația frecvențelor genotipurilor dintr-o populație. Selecția ulterioară pentru sau împotriva anumitor genotipuri are potențialul de a afecta frecvențele generale ale alelelor pe care le conțin, dar este important *de reținut că* împerecherea nealeatorie nu *modifică direct frecvențele alelelor de la sine* .

Împerecherea non- aleatorie poate lua mai multe forme. În împerecherea selectivă pozitivă , genotipurile similare sunt mai predispuse să se împerecheze decât cele mai puțin similare. Acest lucru se întâmplă adesea la oameni: mai multe studii indică faptul că mulți oameni sunt atrași de indivizi care seamănă fizic cu ei înșiși (și care, prin urmare, sunt și mai predispuși să fie similari genetic). Împerecherea selectivă negativă are loc atunci când genotipuri diferite sunt mai predispuse să se împerecheze între ele; unele specii de plante au un sistem integrat de recunoaștere a polenului/stigmei care previne fertilizarea între indivizi cu aceleași alele la o serie de loci cheie . Cu toate acestea , cea mai comună formă de împerechere non-aleatorie care afectează frecvențele genotipurilor unei populații este consangvinizarea .

Endogamie

Consangvinitatea are loc atunci când indivizii care se împerechează sunt mai strâns înrudiți unul cu celălalt decât oricare doi indivizi selectați aleatoriu din populație; pentru a o defini oarecum imprecis , consangvinitatea este împerecherea între rude. Pentru o anumită alelă , consangvinitatea crește proporția de homozigoți din populație . O populație complet consangvinizată ar consta teoretic exclusiv din genotipuri homozigote .

Pentru a descrie gradul de consangvinizare în cadrul unei populații , geneticianul Sewall Wright a inventat coeficientul de consangvinizare (F). *F* cuantifică probabilitatea ca cele două

alele ale unei anumite gene la un individ să fie identice deoarece *descind din aceeași copie a alelei, prezentă la un strămoș.* Dacă $F \neq 1$, toți indivizii din populație sunt homozigoți, iar ambele alele ale fiecărui individ vor deriva din aceeași copie ancestrală. Dacă $F = 0$, niciun individ nu va avea două alele derivate dintr-o copie ancestrală comună.

Figura 25.17 prezintă o metodă de estimare a *lui F* pentru un individ. În acest pedigree, femela din a patra generație (roz) este fiica a doi veri primari (galben). Să presupunem că străbunica ei (verde) purta o alelă letală recesivă, *a.* Care este probabilitatea ca această femelă din a patra generație să fi moștenit două copii ale alelei letale de la străbunica ei? Pentru ca acest lucru să se întâmple, (1) străbunica trebuie să fi transmis o copie a alelei fiului ei, (2) fiul ei trebuie să o fi transmis fiicei sale și (3) fiica ei trebuie să o fi transmis fiicei sale.

ACUM REZOLVĂ ASTA

25.3 Un potențial logodnic complet sănătos are o soră cu fibroză chistică (FC), o boală autosomal recesivă . Părinții lor sunt sănătoși. Fratele intenționează să se căsătorească cu o femeie fără antecedente familiale de FC. Care este probabilitatea ca aceștia să aibă un copil cu fibroză chistică? Ambii sunt de origine central-europeană, iar frecvența generală a FC în populația central -europeană este de 1 /2.500; adică 1 copil afectat la fiecare 2.500. (Presupunem că populația satisface ipotezele Hardy-Weinberg.)

- **SUGESTIE:** *Această problemă implică înțelegerea modului în care se moștenesc trăsăturile recesive și cum se utilizează istoricul familial pentru a calcula probabilitatea ca un individ să fie heterozigot. Cheia rezolvării acesteia constă în cunoașterea factorilor de risc pentru bărbați și femei. (*

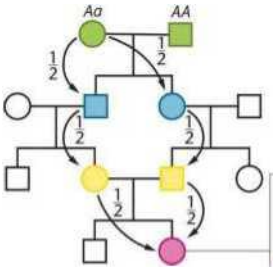
femela roz). De asemenea, (4) străbunica trebuie să fi transmis o copie a alelei fiicei sale , (5) fiica ei trebuie să o fi transmis fiului ei și (6) fiul ei trebuie să o fi transmis fiicei sale (femela roz). Fiecare dintre evenimentele necesare are o probabilitate individuală de 1/2 și *toate* trebuie să se producă. Prin urmare, probabilitatea ca femela roz să moștenească două copii ale alelei letale de la străbunica sa este (1 Z2) $^{până\ la}$ = 1/64. Pentru a calcula o valoare F generală pentru *femela* roz ca fiică a unei căsătorii de frați de același rang, rețineți că ea ar putea moșteni, de asemenea, două copii ale oricăreia dintre celelalte trei alele prezente la străbunicii ei. Deoarece există patru posibilități care ar duce la faptul că femela roz are două alele identice descendente dintr-o singură copie ancestrală,

$$F = 4 \text{ X } (1/64) = 1/16$$

25,9

Fluxul genetic redus, selecția și deriva genetică pot duce la speciație.

Putem defini o specie ca un grup de organisme cu potențial de împerechere și care este izolat reproductiv în natură de toate celelalte astfel de grupuri. La organismele care se reproduc sexuat, speciația transformă fondul genetic al speciei - mamă sau împarte un singur fond genetic în două sau mai multe fonduri genetice separate și distincte . Pot apărea și modificări ale morfologiei sau fiziologiei, sau adaptări la nișe ecologice, dar acestea nu sunt - componente necesare ale evenimentului de speciație. Speciația poate avea loc treptat sau pe parcursul câtorva generații .



La probabilidad de que esta mujer herede dos copias del alelo o de su bisabuela es

F= 2^X1^X2 $\frac{1}{64}$

Puesto que los dos aleios de la mujer podrían ser idénticos por descendencia de cuatro posibles alelos diferentes.

F = 4X

FIGURA 25.17 Calculo del coeficiente de endogamia (F) para la descendencia de un matrimonio entre primos hermanos.

După cum am văzut anterior, majoritatea populațiilor conțin o variație genetică considerabilă, iar diferite populații ale unei specii pot purta alele distincte sau frecvențe alele diferite în diverse loci. Divergența genetică între aceste populații poate fi cauzată de selecția naturală, de derivă genetică sau de ambele. Într-o secțiune anterioară, am văzut că migrația indivizilor între populații, împreună cu fluxul genetic care însoțește această migrație, tinde să omogenizeze frecvențele alelelor între populații. Cu alte cuvinte, migrația contracarează tendința populațiilor de a diverge.

Când fluxul genetic între populații este redus sau complet absent, populațiile pot diverge până la punctul în care membrii unei populații nu se mai pot împerechea cu succes cu membrii alteia. Când populațiile ajung la punctul de izolare reproductivă una de cealaltă, acestea au devenit specii distincte, conform conceptului biologic de specie. Modificările genetice care provoacă izolarea reproductivă între populații și duc la formarea de noi specii (sau grupuri taxonomice de nivel superior) sunt un exemplu de macroevoluție.

Barierele biologice care împiedică sau reduc împerecherea între populații se numesc mecanisme de izolare reproductivă, clasificate în Tabelul 25.4. Aceste mecanisme pot fi ecologice, comportamentale , sezoniere, mecanice sau fiziologice.

Mecanismele de izolare precopulatorie împiedică împerecherea indivizilor de la bun început. Indivizii din populații diferite s-ar putea să nu se găsească la momentul potrivit, s-ar putea să nu se recunoască reciproc ca parteneri potriviți sau ar putea încerca să se împerecheze , dar să constate că nu sunt capabili să o facă.

Mecanismele de izolare postcopulatorie creează izolare reproductivă chiar și atunci când membrii celor două populații sunt capabili și dispuși să se împerecheze . De exemplu, divergența genetică poate fi ajuns într-un stadiu în care viabilitatea sau fertilitatea hibrizilor este redusă. Se pot forma zigoți hibrizi , dar toți sau majoritatea pot fi neviabili. Alternativ, hibrizii pot fi viabili, dar sterili sau pot avea fertilitate redusă . Este chiar posibil ca hibrizii înșiși să fie fertili, dar ca urmașii lor să aibă viabilitate sau fertilitate redusă . În toate aceste situații, hibrizii nu se vor reproduce și sunt în impas genetic . Aceste mecanisme postcopulatorii operează la nivelul zigotului sau dincolo de acesta și sunt o consecință a divergenței genetice .

Mecanismele de izolare postcopulatorie reprezintă o risipă de gameți și zigoți și reduc eficiența reproductivă a hibrizilor supraviețuitori. Prin urmare , selecția va tinde să favorizeze răspândirea alelelor care reduc rata de formare a hibrizilor , ducând astfel la dezvoltarea mecanismelor de izolare precopulatorie , care la rândul lor împiedică împerecherea încrucișată și formarea de zigoți hibrizi și urmași . În evoluția animalelor , unul dintre cele mai eficiente mecanisme precopulatorii este izolarea comportamentală , care implică diferențe în ritualurile de curtare .

Mecanismos precopulatorios

Impiden la fecundación y formación del cigoto

1. Geográficos o ecológicos: las poblaciones viven en las mismas regiones, pero ocupan hábitats diferentes.
2. Estacionales o temporales: las poblaciones viven en las mismas regiones, pero maduran sexualmente en momentos distintos.
3. Comportamentales (solo en animales): las poblaciones están aisladas por comportamientos diferentes e incompatibles antes del apareamiento.
4. Mecánicos: la fecundación cruzada queda impedida o está restringida por diferencias en las estructuras reproductivas (órganos genitales en los animales, flores en las plantas).
5. Fisiológicos: los gametos no consiguen sobrevivir en un tracto reproductivo extraño.

Mecanismos postcopulatorios

La fecundación tiene lugar y se forman cigotos híbridos, pero estos no son viables o dan lugar a híbridos estériles o débiles.

1. No viabilidad o debilidad de los híbridos.
2. Esterilidad en el desarrollo de los híbridos: los híbridos son estériles porque las gónadas se desarrollan de forma anormal o porque la meiosis fracasa antes de llegar a completarse.
3. Esterilidad segregacional de los híbridos: los híbridos son estériles debido a una segregación anormal entre los gametos de cromosomas completos, segmentos de cromosomas o combinaciones de genes.
4. Colapso de la F_2: los híbridos F, son normales, vigorosos y fèrtiles, pero la F_2 contiene muchos individuos débiles o estériles.

Fuente: De *Processes of Organic Evolution,* 3.ª edición, G. Ledyard Stebbins, © 1977, p. 143. Reimpreso con permiso de Pearson Education, Inc.

Schimbări care duc la speciație

Istmul Panama, un pod terestru care leagă America de Nord și de Sud și separă simultan Marea Caraibelor de Oceanul Pacific, s-a format acum aproximativ 3 milioane de ani. Pentru a studia populațiile separate de formarea istmului, cercetătorii au asociat șapte specii de creveți clicker din Caraibe (Figura 25.18) cu specii similare din Pacific. Membrii fiecărei perechi erau mai asemănători ca structură și aspect decât restul speciilor din Pacific. Analiza frecvențelor alele și a secvențelor de ADN mitocondrial a confirmat că membrii fiecărei perechi erau cele mai apropiate rude genetice unul de celălalt.

Interpretarea acestor date este că, înainte de formarea istmului, strămoșii fiecărei perechi erau membri ai aceleiași specii. Când s-a format istmul, fiecare dintre cele șapte specii ancestrale s-a împărțit în două populații separate, una în Caraibe și cealaltă în Pacific.

Când ar fi plasați într-un acvariu de laborator pentru prima dată în trei milioane de ani, membrii caraibieni și pacifici ai unei perechi de specii ar putea recunoaște reciproc ca parteneri potriviți? Masculii au fost împerecheați cu femele, iar înclinația relativă de împerechere a perechilor caraibiene-pacifice a fost calculată și comparată cu cea a perechilor caraibiene-caraibiene sau pacifici-pacifice. Pentru trei dintre cele șapte perechi de specii, perechile transoceanice au refuzat complet să se împerecheze. Pentru celelalte patru perechi de specii, perechile transoceanice au avut o probabilitate de împerechere egală cu 33, 45, 67 și 86% din perechile din același ocean. Dintre perechile din același ocean care s-au împerecheat, 60% au produs ponte viabile. Dintre perechile transoceanice care s-au împerecheat, doar 1% au produs ponte viabile. Putem concluziona din aceste rezultate că 3 milioane

FIGURA 25.18 Creveți mormăitori (genul *Alpheus*).

Anii de separare au cauzat o speciație completă sau aproape completă , care implică funcționarea unor mecanisme puternice de izolare pre-copulatorie și post-copulatorie pentru cele șapte perechi de specii.

Rata macroevoluției și a speciației : Cât durează speciația? În multe cazuri , divergența dintre populații și apariția de noi specii au loc pe o perioadă lungă de timp. Cu toate acestea , în alte cazuri, divergența genetică , izolarea reproductivă și speciația pot fi surprinzător de rapide.

Lacurile din Valea Marelui Rift din Africa de Est (Figura 25.19) găzduiesc sute de specii de pești ciclide . Ciclidele sunt extrem de specializate în diferite nișe. Unele mănâncă alge care plutesc la suprafața apei , în timp ce altele se hrănesc pe fundul lacului , sunt insectivore, mănâncă moluște sau sunt prădători ai altor specii de pești . Lacul Tanganyika este un lac foarte vechi, format acum aproximativ 20 de milioane de ani și în...

FIGURA 25.19 Lacurile din Valea Marelui Rift din Africa de Est găzduiesc majoritatea speciilor de ciclide, pești de apă dulce.

Peste 200 de specii de ciclide au fost identificate în acest lac, multe altele urmând să fie descoperite. Analizele genetice indică faptul că majoritatea speciilor din acest lac descind dintr-un singur strămoș comun și au divergit în interiorul lacului lor natal.

Speciile de ciclide din Lacul Tanganyika sunt organizate în 16 grupuri numite triburi; se crede că toate speciile din cadrul fiecărui trib descind dintr-o specie ancestrală comună. Într -un studiu privind originile ciclidelor din Lacul Tanganyika, Norihiro Okada și colaboratorii săi au examinat inserarea unei noi familii de secvențe repetitive de ADN numite elemente scurte împrăștiate (SINE), pe care le-am discutat în Capitolul 11, în genomurile speciilor de ciclide din Lacul Tanganyika. SINE-urile sunt un tip de retropozon, iar integrarea aleatorie a unui SINE la un locus este de obicei un eveniment ireversibil . Dacă un SINE este prezent la același locus în genomul tuturor speciilor examinate, aceasta este o dovadă puternică că toate speciile descind dintr-un strămoș comun. Folosind un SINE numit AFC, echipa lui Okada a examinat 33 de specii de ciclide aparținând a patru triburi. În fiecare trib, SINE-ul a fost prezent în toate locurile analizate, indicând faptul că speciile din fiecare trib descind dintr-o singură specie ancestrală (Figura 25.20). Speciația ciclidelor în Lacul Tangonica a avut loc de-a lungul a câteva milioane de ani și a produs cea mai diversă colecție de specii din acest pește de apă dulce.

În schimb , Lacul Victoria, un lac din apropiere, din Valea Marelui Rift , are o vechime de doar aproximativ 400.000 de ani și a secat de mai multe ori de-a lungul istoriei sale, cel mai recent acum aproximativ 15.000 de ani. Se crede că cele aproximativ 500 de specii de ciclide pe care le găzduiește în prezent acest lac s-au diversificat dintr -un număr foarte mic de specii fondatoare. Dacă acest lucru este adevărat, înseamnă că speciile noi s-au format într-un ritm foarte rapid , în medie câte o specie la fiecare 30 de ani. Dacă cercetări suplimentare care utilizează elemente SINE și alți markeri moleculari pot confirma numărul de specii fondatoare și pot stabili organizarea lor tribală, am avea dovezi ale celei mai rapide divergențe evolutive a speciilor documentate vreodată la vertebrate.

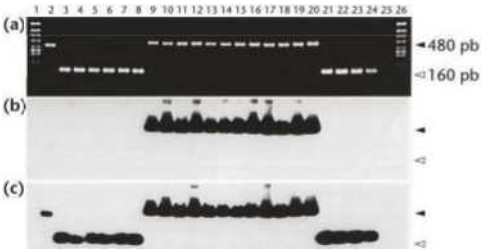


FIGURA 25.20 Utilizarea elementelor repetitive de ADN pentru a determina relația la ciclidele din Lacul Tanganyika.
(a) Fotografie a unui gel de agaroză care prezintă fragmente PCR generate de primeri care flanchează familia AFC a SINES. Fragmente mari care conțin această familie sunt prezente în toate probele de ADN genomic de la membrii tribului de ciclide Lamprologini (benzile 9-20). ADN-ul de la specia din banda 2 are un fragment similar, dar mai scurt, care poate reprezenta o altă secvență repetitivă . ADN-ul de la alte specii (benzile 3-8 și 21-24) produce fragmente scurte care nu conțin secvențe SINE . (b) O analiză Southern blot a gelului de la (a) unde ADN-ul din familia AFC a SINES a fost utilizat ca sondă. AFC este prezent în ADN -ul tuturor speciilor din tribul Lamprologini (benzile 9-20), dar nu și în ADN-ul altor specii (benzile 2-8 și 21-24). (c) O a doua hibridizare Southern blot a gelului de la (a) a fost efectuată utilizând secvența genomică în care se inserează AFC SINE ca sondă . Toate speciile examinate (benzile 2-24) conțin secvența de inserție. Cele mai mari fragmente din ADN -ul Lamprologini (benzile 9-20) corespund celor din hibridizarea anterioară, arătând că gena SINE se inserează în același situs la toate speciile tribului. În concluzie, aceste date arată că gena SINE AFC este prezentă numai la membrii acestui trib, este prezentă la toți membrii și se inserează în același situs în toate cazurile . Aceste rezultate sunt interpretate ca dovadă că speciile tribului în cauză au o origine comună.

25.10

Filogenia poate fi utilizată pentru a analiza istoria evoluției

Speciația este asociată cu schimbări în structura genetică a populațiilor și cu divergența genetică în cadrul acestor populații. Prin urmare, ar trebui să putem folosi diferențele genetice dintre speciile actuale pentru a

Reconstruiți istoriile lor evolutive, sau filogeniile. Aceste relații - sunt adesea prezentate sub formă de arbori filogenetici (Figura 25.21), care arată relațiile ancestrale dintre un grup de organisme. Aceste grupuri pot fi specii sau grupuri mai mari. Într-un arbore filogenetic, ramurile reprezintă linii de-a lungul timpului . Lungimea unei ramuri poate fi arbitrară sau poate fi calculată dintr-o scală de timp, care arată intervalul de timp dintre evenimentele de speciație. Punctele în care liniile diverg, numite noduri, arată momentul în care o specie s-a divizat în două sau mai multe specii. Fiecare nod reprezintă un strămoș comun al speciei care a divergit la acel nod. Vârfurile ramurilor reprezintă specii (sau grupuri mai mari) care sunt în viață astăzi (sau care au dispărut).

FIGURA 25.21 Elemente ale unui arbore filogenetic care prezintă relațiile dintre specii. Rădăcina reprezintă un strămoș comun al tuturor speciilor din arbore. Ramurile reprezintă linii genetice de-a lungul timpului. Punctele în care ramurile diverg se numesc noduri, iar speciile vii (sau dispărute) sunt prezentate la vârfurile ramurilor.

Grupurile compuse dintr-o specie ancestrală și toți descendenții acesteia se numesc grupuri monofiletice. Rădăcina unui arbore filogenetic reprezintă cel mai vechi strămoș comun al tuturor celor arătați în arbore.

Construcția arborilor filogenetici din secvențe de aminoacizi

Într-un exemplu important de pionierat al reconstrucției filogenetice, W.M. Fitch și E. Margoliash au compilat date despre secvența de aminoacizi a citocromului c la diverse organisme. Citocromul c este o componentă a lanțului de transport al electronilor din mitocondrii, iar secvența sa de aminoacizi a evoluat foarte lent. De exemplu, secvența sa de aminoacizi la oameni și cimpanzei este identică, iar între oameni și maimuțele rhesus există o diferență de un singur aminoacid. Această asemănare este remarcabilă, având în vedere că registrul fosil indică faptul că liniile care au dus la oameni și maimuțe s-au desprins de un singur strămoș.

Diferențe de aminoacizi și distanțe mutaționale minime între citocromul c la oameni și alte organisme

TABELUL 25.5

Corp	(a) Diferențe de aminoacizi	(b) Distanța minimă de mutație
Ființă umană	0	0
Cimpanzeu	0	0
maimuță rhesus	1	1
Iepure	9	12
Porc	10	13
Câine	10	13
Cal	12	17 ani
Pinguin	11	18 ani
Molie	24	36
Drojdie	38 de ani	56

Sursă: Din WM Fitch și E. Margoliash, Construcția arborilor filogenetici, *Science* 155: 279-284, 20 ianuarie 1967. Retipărit cu permisiunea AAAS.

strămoș comun acum aproximativ 20 de milioane de ani .

Coloana (a) din Tabelul 25.5 prezintă numărul de diferențe de aminoacizi dintre citocromul c al oamenilor și cel al diferitelor alte specii. Datele din acest tabel concordă, în general, cu intuițiile noastre despre gradul nostru de înrudire cu aceste alte specii. De exemplu, majoritatea oamenilor ar fi de acord că suntem mai strâns înrudiți cu alte mamifere decât cu insectele și mai strâns înrudiți cu insectele decât cu drojdia. În consecință , citocromul nostru c diferă cu 10 aminoacizi de cel al câinilor , cu 24 de aminoacizi de cel al moliilor și cu 38 de aminoacizi de cel al drojdiei.

Modificările aminoacizilor rezultă din modificările nucleotidelor și poate fi nevoie de mai mult de o modificare a nucleotidelor pentru a altera un anumit aminoacid . Atunci când modificările nucleotidelor necesare care explică toate diferențele dintre aminoacizii dintr -o proteină sunt însumate , se determină distanța minimă mutațională dintre genele oricăror două specii . Coloana (b) din Tabelul 25.5 prezintă această analiză pentru genele care codifică citocromul c. Așa cum era de așteptat , aceste valori sunt mai mari decât numărul corespunzător de aminoacizi care separă oamenii de celelalte nouă organisme enumerate.

Datele privind distanțele mutaționale minime dintre genele citocromului c ale 19 organisme au fost utilizate pentru a reconstrui istoria lor evolutivă. Rezultatul este un arbore filogenetic care prezintă relațiile dintre speciile studiate (Figura 25.22). Cercurile negre de la vârfurile ramurilor reprezintă specii existente, ai căror strămoși comuni deduși sunt legați de acestea prin linii verzi care diverg la noduri (cercuri roșii). Strămoșii comuni sunt conectați la alți strămoși comuni, mai vechi , culminând cu un singur strămoș comun pentru toate speciile din arbore, care este reprezentat de cercul roșu din stânga .

Ceasurile moleculare măsoară viteza schimbării evolutive

În multe cazuri, am dori să estimăm nu doar care membri ai unui grup de specii sunt cei mai strâns înrudiți, ci și când au trăit strămoșii lor comuni. Uneori, putem face acest lucru folosind ceasuri moleculare - secvențe de aminoacizi sau nucleotide în care schimbările evolutive se acumulează într -o rată constantă în timp .

Cercetările asupra virusului gripal A arată cum sunt construite și utilizate ceasurile moleculare . Au fost secvențiate porțiuni ale genei hemaglutininei din tulpini .

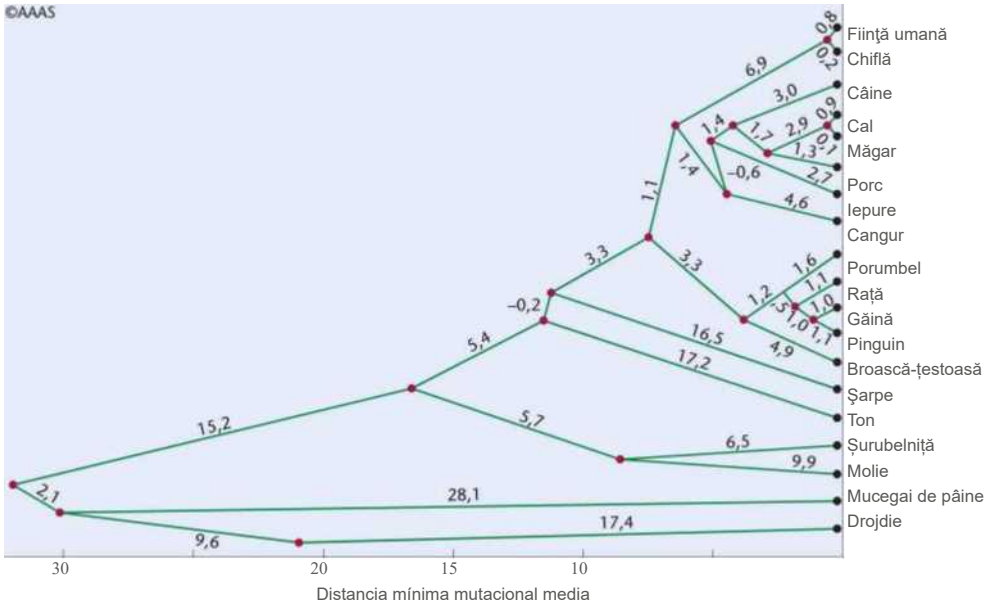


FIGURA 25.22 Arbore filogenetic construit prin compararea omologiilor dintre secvenţele de aminoacizi ale citocromului c.
Retipărit cu permisiunea lui Fitch, WM şi Margoliash, E. 1967. Construcţia arborilor filogenetici. Science 279: 279-284, Figura 2.

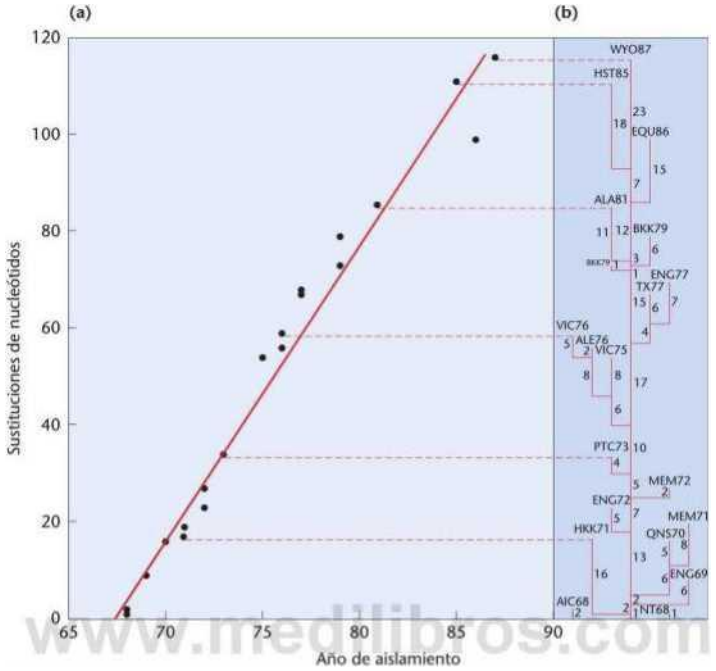
Tulpinile virale au fost izolate pe o perioadă de 20 de ani. A fost construit un arbore filogenetic folosind numărul de diferenţe de nucleotide dintre aceste tulpini [Figura 25.23(b)]. Majoritatea tulpinilor sunt acum dispărute şi nu au descendenţi . Reprezentarea grafică a numărului de substituţii de nucleotide între tulpini în funcţie de anul în care au fost izolate arată că punctele formează ceva foarte asemănător cu o linie dreaptă [Figura 25.23(a)]. Aceasta înseamnă că substituţiile de nucleotide din gena hemaglutininei s-au acumulat într-o rată constantă şi, prin urmare , servesc drept ceas molecular pentru urmărirea evoluţiei virusului gripal A.

Acest ceas molecular este folosit şi pentru a compara secvenţa genei hemaglutininei a noilor virusuri gripale pe măsură ce apar în fiecare an, precum şi pentru a estima cât timp a trecut de când fiecare dintre ele s-a abătut de la un strămoş comun.

Ceasurile moleculare trebuie calibrate cu atenţie şi utilizate cu precauţie. De exemplu, datele indică faptul că tulpinile de gripă A care trec de la păsări la oameni au evoluat mult mai rapid decât tulpinile care au rămas la păsări . Prin urmare , un ceas molecular calibrat din tulpinile umane ale virusului ar oferi rezultate inexacte dacă ar fi aplicat tulpinilor aviare .

Analiza divergenţei genetice dintre neanderthalieni şi oamenii moderni

Dovezile fosile indică faptul că neanderthalienii, *Homo neanderthalensis,* au trăit în Europa şi Asia de Vest de acum aproximativ 300.000 de ani până la dispariţia lor în urmă cu aproximativ 30.000 de ani. Timp de cel puţin 30.000 de ani, neanderthalienii au coexistat cu oamenii anatomic moderni *(Homo sapiens)* în mai multe regiuni. Analizele genetice care utilizează secvenţierea ADN-ului ne-au ajutat să răspundem la mai multe întrebări despre neanderthalieni şi oamenii moderni: (1) Au fost neanderthalienii strămoşii direcţi ai oamenilor moderni? (2) S-au încrucişat neanderthalienii şi specia noastră , *H. sapiens* , astfel încât genomurile noastre să poarte gene neanderthaliene? Sau neanderthalienii au dispărut şi s-au extins fără a lăsa nicio moştenire genetică? (3) Ce putem spune despre asemănările şi diferenţele dintre genomul nostru şi cel al neanderthalienilor?



www.medilibros.com

FIGURA 25.23 Ceasul molecular filogenetic al genei hemaglutininei din virusul gripal A. (a) Numărul de diferențe de nucleotide față de prima tulpină izolată în funcție de anul izolării, (b) Estimarea filogeniei tulpinilor izolate .

la altele, cercetătorii au folosit două tehnici, ambele necesitând secvențierea ADN-ului recuperat din oasele omului de Neanderthal . O tehnică a implicat analiza ADN-ului mitocondrial recuperat din schelete găsite în Peștera Feldhofer din Germania și Peștera Mezmaiskaya din Munții Caucaz, la est de Marea Neagră . ADN-ul de la Feldhofer și ADN-ul mitocondrial (ADNmt) de la peste 2.000 de oameni din prezent au fost utilizate pentru a construi un arbore filogenetic [Figura 25.24 (a)]. Din structura arborelui , cercetătorii au concluzionat că neanderthalienii sunt o rudă îndepărtată a oamenilor moderni. ADN-ul mt recuperat din scheletul Mezmaiskaya a fost secvențiat și comparat cu secvența din scheletul Feldhofer . Deși cele două secvențe de ADNmt neanderthal provin din locații aflate la peste 1.500 de kilometri distanță , ele diferă doar cu aproximativ 3,5 %. Acest lucru indică faptul că probele neanderthaliene provin dintr-un singur fond genetic. Analiza filogenetică care compară cele două secvențe neanderthaliene cu cele ale oamenilor moderni și ale cimpanzeilor plasează neanderthalienii într-un grup clar distinct de oamenii moderni (Figura 25.24 (b)). Concluzia studiului ADN-ului mitocondrial este că, deși neanderthalienii și oamenii au un strămoș comun, neanderthalienii au fost o linie hominidă diferită și nu au contribuit cu gene mitocondriale la *H. sapiens*.

Proiectul Genomului Neanderthalian

a ADN-ului neanderthalian a fost un proiect ambițios care viza izolarea și secvențierea genomului neanderthalian. Echipa internațională de cercetare a început prin izolarea ADN-ului de la trei femei neanderthaliene ale căror schelete au fost găsite într-o peșteră din Croația. Folosind tehnici de secvențiere a ADN-ului nou descoperite, au asamblat o schiță de secvență a genomului neanderthalian. Ca parte a proiectului, au secvențiat, de asemenea, genomurile a cinci persoane vii din diferite părți ale lumii.

Genomul neanderthalian conține aproximativ 3,2 miliarde de perechi de baze, același număr ca genomul speciei noastre.

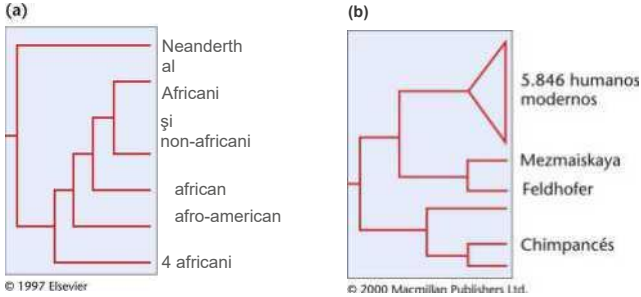


FIGURA 25.24 (a) Un arbore filogenetic estimat din secvențele de ADN mitocondrial ale unui neanderthalian și ale mai multor (a) 2.000 de oameni moderni. *Din Krings, M. și colab., 1997. celula 90: 19-30. Figura 7A, p. 26, copyright 1997 cu permisiunea Elsevier;* (b) Un arbore filogenetic estimat din analiza a peste 5.000 de oameni moderni, din probele neanderthaliene din peștera Feldhofer și peștera Mezmaiskaya și de la cimpanzei.

De Ovchinnikov, IV și colab., 2000. Analiza moleculară a ADN-ului neanderthalian din Caucazul de Nord. Nature 404: 490-493 copyright 2000 Macmillan Publishers Ltd.

Este identic în proporție de 99,7% cu genomul nostru. Atât genomul neanderthalian, cât și al nostru sunt identice în proporție de aproximativ 98,8% cu cel al cimpanzeului.

Comparând secvența genomului neanderthalian cu cea a cinci oameni moderni și cu genomul cimpanzeului , cercetătorii au reușit să identifice diferențe de codificare a aminoacizilor în 78 de gene - diferențe care au apărut după separarea dintre liniile neanderthaliene și umane. Aceste gene sunt implicate în dezvoltarea cognitivă, morfologia pielii și dezvoltarea scheletică . În plus, există dovezi că mai multe regiuni ale genomului uman modern au suferit o selecție pozitivă în perioada de timp de când neanderthalienii și oamenii moderni au avut ultimul strămoș comun.

Poate cea mai neașteptată descoperire a acestei analize este că genomurile oamenilor de astăzi din Europa și Asia, dar nu și din Africa, sunt compuse din 1-4% secvențe neanderthaliene . Încrucișarea cu neanderthalienii ar fi putut avea loc undeva în Orientul Mijlociu înainte ca oamenii să migreze în Europa și Asia. Nu a fost detectată nicio contribuție neanderthaliană la genomurile africane, dar un eșantion mai mare de populații africane ne-ar putea permite să determinăm dacă unii africani poartă gene neanderthaliene.

Genomica comparativă combinată cu registrul fosil a permis oamenilor de știință să construiască un arbore filogenetic care arată modelul și momentul divergenței dintre neanderthalieni și specia noastră (Figura 25.25). Presupunând că cimpanzeii și oamenii au avut ultima dată un strămoș comun în urmă cu aproximativ 6,5 milioane de ani, arborele arată că neanderthalienii și oamenii au avut ultima dată un strămoș comun în urmă cu aproximativ 706.000 de ani și că separarea care a izolat în cele din urmă populațiile de neanderthalieni și oameni a avut loc în urmă cu aproximativ 370.000 de ani. Din aceste studii se pot trage mai multe concluzii. În primul rând, neanderthalienii nu sunt strămoșii direcți ai speciei noastre. În al doilea rând , neanderthalienii și membrii speciei noastre s-ar fi putut încrucișa, dar rezultatele disponibile indică faptul că neanderthalienii nu au adus contribuții semnificative la genomul nostru . Ca specie, neanderthalienii sunt dispăruți, deși unele dintre genele lor supraviețuiesc în genomul uman. În al treilea rând, pe baza a ceea ce știm despre genomul neanderthalian , împărtășim majoritatea genelor noastre și a altor secvențe cu aceștia.

Analize suplimentare ne vor permite să obținem răspunsuri mai interesante la întrebarea asemănărilor și diferențelor dintre genomul nostru și cel al neanderthalienilor . Această cercetare ne va permite, de asemenea, să identificăm diferențele cheie care definesc specia noastră și, în acest proces, să revoluționăm domeniul evoluției umane .

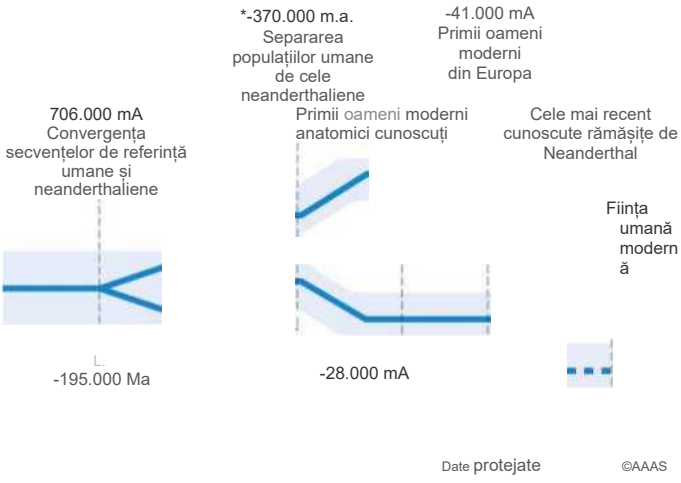

*-370.000 m.a.
Separarea populațiilor umane de cele neanderthaliene
-41.000 mA
Primii oameni moderni din Europa
706.000 mA
Convergența secvențelor de referință umane și neanderthaliene
Primii oameni moderni anatomici cunoscuți
Cele mai recent cunoscute rămășițe de Neanderthal
Ființa umană modernă
-195.000 Ma
-28.000 mA
Date protejate
©AAAS
Linia evolutivă a secvențelor de referință umane și neanderthaliene
Linia evolutivă a populațiilor ancestrale umane și neanderthaliene

FIG URA25.25 Momentele așteptate de divergență între secvențele genomului uman și al neanderthalienilor și , ulterior , *ale* populațiilor acestora, în raport cu evenimente cheie din evoluția atât a omului , cât și a neanderthalienilor . Aceste estimări se bazează pe secvențierea a 18.000 de perechi de baze de ADN neanderthalian (ma = acum *milioane* de ani).
De Noonan, J.P. și colab. 2006. Secvențierea și analiza ADN-ului genomic neanderthalian. **Science** *314'-1113-1113.*

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

H

Urmărind amprentele noastre genetice în afara Africii

În ultimul secol, paleoantropologii au aplicat o varietate de instrumente științifice sofisticate pentru a explora originile noastre și relațiile umane.

Pe baza caracteristicilor fizice și a distribuției fosilelor de hominizi , majoritatea paleoantropologilor sunt de acord că un hominid cu creier mare , folositor de unelte , cunoscut sub numele de *Homo erectus,* a apărut în Africa de Est acum aproximativ 2 milioane de ani . Această specie folosea unelte simple din piatră și vâna, dar nu pescuia, nu construia case sau vetre și nu practica ritualuri funerare . Acum aproximativ 1,7 milioane de ani, *H. erectus* s-a răspândit în Eurasia și Asia de Sud . Majoritatea oamenilor de știință sunt, de asemenea, de acord că *H. erectus* a evoluat probabil în mai multe tipuri de hominizi, inclusiv - neanderthalienii (în Europa) și omul de Peking sau omul de Java (în Asia). Acești hominizi erau robusti din punct de vedere anatomic, cu schelete și cranii mari și grele. Neanderthalienii și alte grupuri de *Homo erectus au dispărut acum aproximativ 50.000 până la 30.000 de ani - cam în aceeași perioadă în care* oamenii anatomic moderni (Homo *sapiens)* au apărut în întreaga lume. În acest moment al istoriei noastre - când hominizii antici au cedat locul oamenilor anatomic moderni - apare controversa .

În prezent, există două ipoteze principale care încearcă să explice originile oamenilor moderni: ipoteza multiregională și ipoteza originii africane. Ipoteza multiregională se bazează în principal pe dovezi arheologice și fosile . Ea propune că *H. sapiens* a evoluat treptat și simultan la nivel mondial din grupurile existente de *H. erecta* , inclusiv neanderthalienii . Încrucișarea dintre aceste grupuri a dus în cele din urmă la transformarea *lui H. sapiens într-o* specie omogenă genetic . Selecția naturală pe tot parcursul...

1,5 Milioane de ani au creat apoi variațiile regionale pe care le vedem astăzi. Din perspectiva ipotezei multiregionale, structura noastră genetică

ar trebui să includă contribuții din partea multor grupuri de *H. erectus,* inclusiv neanderthalienii. În schimb, ipoteza originii africane, bazată în principal pe analize genetice ale populațiilor

umane moderne , susține că *H. sapiens* A evoluat din descendenții lui *H. erectus* în Africa subsahariană , acum aproximativ 200.000 de ani. Un grup mic de *H. sapiens* (mai puțin de 1.000) a părăsit apoi Africa, s-a răspândit și a migrat în Europa și Asia acum aproximativ 60.000 de ani. Acum aproximativ 40.000 de ani, populațiile de *H. sapiens* au ajuns în Australia și ulterior au migrat în America de Nord. În modelul originii africane, *H. sapiens* a înlocuit toate tipurile preexistente de *H. erectus* fără a se încrucișa cu acestea. În acest fel, *H. sapiens* a devenit singura specie a genului uman acum aproximativ 30.000 de ani.

Deși ipoteza originii africane rămâne dezbătută, majoritatea dovezilor genetice par să o susțină . Oamenii din întreaga lume sunt remarcabil de asemănători din punct de vedere genetic . Secvențele de ADN a oricăror doi indivizi selectați aleatoriu sunt identice în proporție de 99,9 % . Există o identitate genetică mai mare între oricare doi indivizi selectați aleatoriu dintr-o populație umană decât între oricare doi cimpanzei selectați aleatoriu dintr -o populație de cimpanzei . Interesant este că aproximativ 90 % din diferențele genetice existente apar între indivizi, mai degrabă decât între populații. Acest grad neobișnuit de ridicat de înrudire genetică între toți oamenii din întreaga lume susține ideea că specia noastră a apărut relativ recent dintr -un mic grup fondator de oameni.

Studiile secvențelor de ADN mitocondrial din populațiile umane actuale arată că cele mai ridicate niveluri de variație genetică apar în rândul populațiilor africane. Africanii - prezintă o diversitate dublă a secvențelor de ADN mitocondrial față de non - africani. Aceasta implică faptul că cele mai vechi ramuri ale *lui Homo sapiens* au divergit în Africa și au avut mai mult timp pentru a acumula mutații ale ADN-ului mitocondrial, despre care se crede că se acumulează într- o rată constantă în timp .

Secvențele de ADN de la markerii - mitocondriali , cromozomul Y și cromozomul 21 susțin ideea că rădăcinile umane se află în Africa de Est și că migrația din Africa a avut loc prin Etiopia, de-a lungul coastei Peninsulei Arabice și în Eurasia și Asia de Sud-Est . Date recente bazate pe variante de microsateliți nucleari și analiza polimorfismului nucleotid unic (SNP) la nivelul întregului genom oferă - dovezi suplimentare că oamenii au migrat din Africa și s-au răspândit la nivel global dintr -o populație fondatoare mică .

Ca în cazul oricărei explicații a originilor umane, ipoteza originii africane este activ dezbătută . Pe măsură ce metodele de secvențiere a ADN-ului fosilelor antice se îmbunătățesc, ar putea deveni posibil să se completeze lacunele lipsă din ruta genetică de ieșire din Africa și să se rezolve aceste dispute de lungă durată despre originile noastre.

Rândul tău

1. Secvențierea ADN-ului neanderthalian - arată că acesta este atât de diferit de al nostru încât neanderthalienii ar fi putut fi o specie separată și că neanderthalienii și *Homo sapiens* s-au separat acum aproximativ 600.000 de ani . Cu toate acestea, dezbaterea continuă cu privire la faptul dacă Homo *sapiens* și neanderthalienii s-au încrucișat și, dacă da, în ce măsură. Prezentarea de dovezi care susțin și infirmă ideea că neanderthalienii și *Homo sapiens s-au încrucișat.* S-au intersectat.

Începeți-vă cercetarea citind Green, RE și colab. 2010. O schiță de secvență a genomului neanderthalian. *Science* 328: 710-722.

2. Dacă toți oamenii de pe Pământ sunt foarte asemănători din punct de vedere genetic , cum se face că prezentăm o gamă atât de largă de diferențe fizice pe care unii le descriu drept diferențe rasiale? Cum a contribuit genomica modernă la dezbaterea despre validitatea și definiția termenului rasă ?

O discuție interesantă despre rasă și modul în care studiile genomice ne schimbă conceptele despre strămoșii umani este oferită de site-ul Wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/race_(clasificarea_oamenilor). *Puteți găsi un studiu al structurii populației umane, bazat pe analiza - microsateliților , la http://en.wikipedia.org/wiki/race_(clasificarea_oamenilor).* Rosenberg, N.A. și colab. 2002. Structura genetică a populațiilor umane. *Știință* 298: 2381-2385.

3. Geneticienii studiază ADN-ul mitocondrial și ADN-ul cromozomului Y pentru a determina originea oamenilor moderni. De ce sunt folosite aceste două tipuri de ADN în studiile de descendență? Ce înseamnă termenii Eva mitocondrială *și Adam cromozom Y ?*

Pentru a citi articolul original care propune - ipoteza Evei mitocondriale, vezi Cann, R.L. și colab. 1987. ADN-ul mitocondrial și evoluția umană. Nature 325: 31–36. *Pentru o prezentare a cromozomului Y Adam, vezi* Gibbons , A. 1997. Cromozomul Y arată că Adam era african. *Science* 278: 804-805.

STUDIU DE CAZ | Un rezultat neașteptat

SAU

Un program de screening neonatal a identificat un bebeluș cu o tulburare autosomal recesivă rară numită acidurie argininosuccinică (AGA), care determină acumularea de niveluri ridicate de amoniac în sânge. Simptomele apar de obicei în prima săptămână după naștere și pot progresa până la leziuni hepatice severe, întârzieri de dezvoltare și dizabilități intelectuale. AGA apare la aproximativ 1 din 70.000 de nașteri. Nu a existat niciun istoric al acestei tulburări în familia tatălui sau a mamei. Acest caz ridică mai multe întrebări:

1. Întrucât părinții neafectați par a fi heterozigoți, ar putea părea neobișnuit că nu există antecedente familiale ale acestei tulburări? Cum ar putea fi informați cu privire la riscurile pentru viitorii lor copii?
2. Dacă tulburarea este atât de rară, care este frecvența purtătorilor heterozigoți în cadrul populației?
3. Care este probabilitatea ca doi heterozigoți să se întâlnească și să aibă un copil afectat de această tulburare?

zona de studiu la www.masteringgenetics.com

Puncte de rezumat

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați

1. Variația genetică este o caracteristică a majorității populațiilor. În unele cazuri, aceasta poate fi observată la nivel fenotipic, dar analiza la nivel de aminoacizi și nucleotide oferă o modalitate mai directă de a estima variația genetică .
2. Folosind ipotezele legii Hardy - Weinberg , este posibil să se estimeze frecvențele alelelor și genelor în cadrul populațiilor .
3. Legea Hardy-Weinberg poate fi aplicată pentru a determina frecvențele alelelor și genotipurilor pentru alele multiple și pentru alele legate de X , precum și pentru a calcula frecvența heterozigoților pentru o anumită - genă.
4. Selecția naturală modifică frecvențele alelelor în populații , ducând la schimbări evolutive. Selecția trăsăturilor cantitative poate implica selecția direcțională, selecția stabilizatoare sau selecția disruptivă .
5. Pe lângă selecția naturală , alte forțe acționează asupra frecvențelor alele ale populațiilor. Acestea includ mutația, migrația și deriva genetică. Împerecherea nealeatorie modifică frecvențele genotipurilor , dar nu și frecvențele alelelor.
6. Formarea de noi specii depinde de formarea subpopulațiilor și de acumularea unor diferențe genetice suficiente, astfel încât, atunci când se reunesc, membrii populațiilor separate să nu se poată încrucișa .
7. Analiza filogenetică utilizând morfologia , secvențele de aminoacizi sau secvențele de nucleotide poate fi utilizată pentru a construi arbori filogenetici care arată relațiile evolutive din cadrul unui grup de organisme. Atunci când sunt calibrate cu ceasuri moleculare , schimbările evolutive dintr-un arbore filogenetic pot fi legate de o scară de timp .
8. Analiza filogenetică, combinată cu date despre secvențele genomice de la oameni, neanderthalieni și alți hominizi, a ajutat oamenii de știință să reconstruiască relațiile dintre neanderthalieni și specia noastră.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. Boala Tay -Sachs este cauzată de mutații cu pierdere a funcției într -o genă de pe cromozomul 15 care codifică o enzimă lizozomală . Boala Tay -Sachs este moștenită ca o tulburare autosomal recesivă. Printre evreii aşkenazi de origine central-europeană , aproximativ 1 din 3.600 de copii se naște cu această boală. Ce procent din indivizii din această populație sunt purtători?

   Soluție: Dacă notăm cu p frecvența alelei enzimei de tip sălbatic și cu q frecvența alelelor recesive cu pierdere de funcție și presupunem că populația se află în echilibru Hardy-Weinberg , atunci frecvențele genotipului vor fi date de următoarele valori : *p* pentru homozigoți normali, *2pq* pentru purtători și q^2 *pentru indivizii cu sindrom Tay-Sachs. Prin urmare* , frecvența alelelor Tay-Sachs va fi:

   q = * * V 3.600 = 0,017

   Din moment ce p 4- q = 1, avem

   p=lq=l - 0,017 = 0,983

   Prin urmare, putem estima că frecvența purtătoarei este

   2pq = 2(0,983)(0,017) = 0,033 sau aproximativ 1 în 30

2. Deodată, apare o singură plantă care este de două ori mai mare decât altele din aceeași populație. În mod normal, plantele acestei specii se reproduc prin autofertilizare și fertilizare încrucișată. Este această nouă plantă gigantică pur și simplu o variantă nouă sau ar putea fi o specie nouă? Cum ați determina care este ?

   Soluție: Unul dintre cele mai răspândite mecanisme de speciație la plantele superioare este poliploidia , multiplicarea seturilor complete de cromozomi. Rezultatul poliploidiei este , în esență, o plantă mai mare , cu flori și semințe mai mari. Există două modalități de a testa noua variantă pentru a determina dacă este o specie nouă. În primul rând , planta gigantică ar trebui încrucișată cu o plantă de dimensiuni normale pentru a vedea dacă planta gigantică produce urmași viabili și fertili. Dacă nu, atunci cele două tipuri diferite de plante par a fi izolate reproductiv . În al doilea rând, planta gigantică ar trebui analizată citogenetic pentru a -i examina complementul cromozomilor. Dacă are de două ori mai mulți cromozomi decât vecinii săi de dimensiuni normale , este o tetraploidă care s- ar fi putut forma spontan. Dacă numărul de cromozomi diferă cu un factor de doi și noua plantă este izolată reproductiv de vecinii săi de dimensiuni normale , atunci este o specie nouă .

Problemas y preguntas para la discusión

Para ver los problemas y tutoriales asignados por el profesor, consulte www.masteringgenetics.com

DE UNDE ȘTIM

1. În acest capitol, ne-am concentrat asupra relației dintre modificările frecvenței genelor și procesul de formare a speciilor. Pe parcursul acestui proces, am avut numeroase ocazii să analizăm metodele și raționamentele care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în acest capitol, ce răspunsuri ați da la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum putem determina câtă variație genetică există într-o populație?
   (b) Ce dovezi au fost obținute în studiile de laborator care indică faptul că selecția naturală este cauza diferențelor genetice dintre populațiile naturale ale unei specii?
   (c) Cum poate fi determinată divergența genetică minimă dintre două specii?
   (d) Cum putem determina ultimul strămoș comun al două specii divergente?
2. Ce tipuri de substituții nucleotidice nu vor fi afectate de secvențierea aminoacizilor din produsul proteic al unei gene?
3. Diferența genetică dintre două specii de Drosophila , *D. heteroneura* și *D. sylvesilis,* măsurată prin diversitatea nucleotidică a acestora , este de aproximativ 1,8 % . Diferența dintre cimpanzei *(P. troglodytes)* și oameni (H. *sapiens)* este aproximativ aceeași , însă aceștia din urmă sunt clasificați în genuri diferite . Este acest lucru valid, în opinia dumneavoastră ? Explicați de ce .
4. Utilizarea datelor secvențelor de nucleotide pentru a măsura variabilitatea genetică este complicată de faptul că genele din eucariotele superioare au o organizare complexă și conțin regiuni flancante 5' și 3', precum și introni. Cercetătorii au comparat secvența de nucleotide a două alele clonate ale genei gama -*globinei* de la un singur individ și au descoperit o variație de 1%. Aceste diferențe au inclus 13 substituții de nucleotide și 3 segmente scurte de ADN care au fost inserate într-o alelă sau șterse din cealaltă . Niciuna dintre modificări nu a avut loc în exonii genei (regiunile codificatoare) . De ce credeți că se întâmplă asta? Ar trebui acest lucru să ne schimbe înțelegerea variației genetice ?
5. Calculați frecvențele genotipurilor *AA, Aa* și aa *după* o generație , dacă populația inițială este formată din genotipurile 0,2 AA , *0,6* Aa *și* 0,2 aa *și* satisface relația Hardy - Weinberg . Care vor fi frecvențele genotipice după o a doua generație ?
6. Să luăm în considerare o afecțiune rară într - o populație cauzată de o mutație autozomal recesivă. Pe baza frecvențelor afecțiunii în cadrul populației considerate, calculați procentul de purtători heterozigoți :
   (a) 0,0064
   (b) 0,000081
   (c) 0,09 (d 0,01
   (e) 0,10
7. Ce ar trebui să presupunem pentru a valida răspunsurile la Problema 6?
8. Într -o populație în care se cunoaște doar numărul total de indivizi cu genotipul dominant , cum putem calcula procentul de purtători și homozigoți recesivi ?
   Determinați dacă următoarele două seturi de date reprezintă populații aflate în echilibru Hardy -Weinberg (utilizați analiza lui *și* [2] (dacă este necesar):
   (a) Genotipuri *CCR5 :* 1/1, 60%; 1/A32, 35,1%; A32/A32, 4,9 %
   (b) Hemoglobina în anemia falciformă: AA, 75,6 % ; *AS,* 24,2 %; 55,0,2%
10. Dacă 4 % dintr-o populație aflată în echilibru exprimă o trăsătură recesivă, care este probabilitatea ca urmașii a doi indivizi care nu exprimă trăsătura să o exprime?
11. luăm în considerare o populație în care frecvența alelei A este *p* — 0,7 și frecvența alelei *a* fie *că* — 0,3 și în care ambele alele sunt codominante. Care vor fi frecvențele alelelor după o generație în următoarele cazuri?
    W "AA = >• "A. = 0.'Y ""« = 0.8 (b) "AA = 1. "A. = 0.95 y»„ = 0,9 (c) "AA = 1. "A. = 0.99, = 0,98
    (<*) "AA = 0,8, = I,"„=0,8
12. Dacă frecvențele alele inițiale sunt *p* = 0,5 și *q* = 0,5 și alela *a* Este recesiv letal, care vor fi frecvențele după 1, 5, 10, 25, 100 și 1.000 de generații?
13. În ce circumstanțe ar putea persista o alelă letală dominantă într-o populație?
14. Să presupunem că o tulburare autosomal recesivă apare la 1 din 10.000 de indivizi (0,0001) din populația generală și că aproximativ 2% (0,02) dintre indivizii din această populație sunt purtători ai tulburării. Estimați probabilitatea ca această tulburare să apară la urmașii unei căsătorii între veri primari. Comparați această probabilitate cu cea a populației generale.
15. Una dintre primele trăsături mendeliene identificate la om a fost o afecțiune dominantă cunoscută sub numele de *brahidactilie.* Această genă provoacă scurtarea anormală a degetelor de la mâini și de la picioare (sau a ambelor). La acea vreme, cercetătorii credeau că trăsătura dominantă se va răspândi până când 75 % din populație va fi afectată (deoarece raportul fenotipic dintre dominant și recesiv este de 3:1). Demonstrați că acest raționament a fost incorect.
16. Acondroplazia este o trăsătură dominantă care provoacă o formă - caracteristică de nanism. Într -un eșantion de 50.000 de nașteri , au fost identificați cinci copii cu acondroplazie. Trei dintre copiii afectați aveau părinți afectați , în timp ce ceilalți doi aveau părinți normali. Calculați rata de mutație pentru acondroplazie și exprimați această rată ca număr de gene mutante la un număr dat de gameți.
17. Un studiu recent care examinează rate de mutație a 5.669 de gene de mamifere (17.208 secvențe) indică faptul că, contrar opiniei populare, ratele de mutație între liniile genetice cu timpi de generație și atribute fiziologice foarte variate sunt remarcabil de constante (Kumar, S. și Subramanian, S. 2002. *Proc. Nati. Acad. Sci.* [USAI 99:803-808). Rata medie este estimată la aproximativ 12,2 x 10^{9} pe pb pe an. Care este semnificația acestei descoperiri în ceea ce privește evoluția mamiferelor ?
18. Enumerați barierele care împiedică trecerea și oferiți câte un exemplu pentru fiecare.
19. Care sunt cele două grupuri de mecanisme de izolare reproductivă ? Care dintre acestea este considerat mai eficient și de ce?

20. Ce este teoria neutră a evoluției moleculare, așa cum a fost propusă de Kimura (1968)? Ce determină frecvența alelelor neutre într-o populație?
21. Care sunt considerați cei mai importanți factori în menținerea nivelului surprinzător de ridicat de variație genetică în cadrul populațiilor naturale ?
22. Un botanist care studia nuferii dintr- un iaz izolat a observat trei forme de frunze în cadrul populației: rotunjite, cu vârf de săgeată și festonate. Analiza markerilor ADN a 125 de indivizi a arătat că plantele cu frunze rotunjite erau homozigote pentru alela rl , în timp ce plantele cu frunze cu vârf de săgeată erau homozigote pentru o alelă diferită la același locus, r2. Plantele cu frunze festonate au prezentat profiluri ADN cu ambii markeri , rl și r2. Frecvența markerului rl a fost estimată la 0,81. Dacă botanistul a numărat 20 de plante cu frunze festonate în iaz , care este coeficientul de consanguinitate *F* ? din această populație ?
23. Un fermier plantează porumb Bt transgenic, modificat genetic pentru a produce propriul insecticid. Dintre larvele de gărgărițe a porumbului care se hrănesc cu aceste plante de porumb Bt, doar 10% supraviețuiesc, cu excepția cazului în care au o copie a alelei de rezistență dominante *B* , care conferă rezistență la insecticidului Bt . Când fermierul plantează pentru prima dată porumb Bt, frecvența alelei de rezistență *B* în populația de gărgărițe a porumbului este de 0,02 . Care va fi frecvența alelei de rezistență după ce o generație de gărgărițe a porumbului s- a hrănit cu porumbul Bt?
24. Într-o populație izolată de 50 de mufloni canadieni , a fost descoperită o alelă mutantă recesivă *c.* ceea ce provoacă blana creț ată atât la masculi, cât și la femele . Alela dominantă normală C produce blană dreaptă . Un biolog care studiază aceste oi muflone numără patru exemplare cu blană creț ată și prelevează probe de sânge pentru analiza markerilor ADN , ceea ce relevă faptul că 17 dintre muflonii *cu* blană dreaptă sunt purtători ai alelei c . Care este coeficientul de consanguinitate *F* ? din această populație?
25. populației de muflon canadian descrisă în Problema 24, se introduc 10 exemplare dintr -o populație originară dintr -o regiune diferită , în care mutația *c* este absent. Presupunând că are loc împerecherea aleatorie între muflonul original și cel introdus și că alela *c* este selectiv neutră, care va fi frecvența lui *c* în următoarea generație?

Pentru a vedea problemele și tutorialele atribuite de profesor, consultați www.masteringgenetics.com

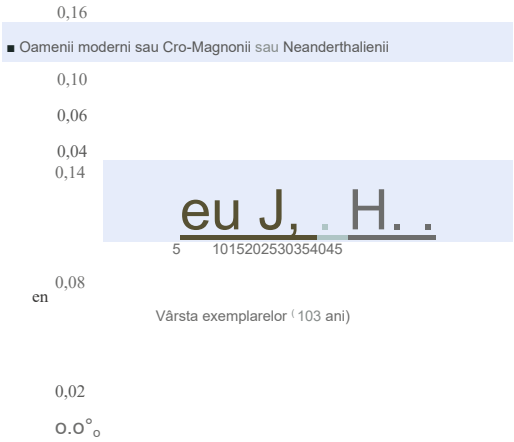
26. O formă de nanism cunoscută sub numele de sindromul Ellis - van Creveld a fost descoperită pentru prima dată la sfârșitul anilor 1930 , când Richard Ellis și Simon van Creveld împărțeau un compartiment de tren în drum spre o conferință de pediatrie . În timpul conversației lor , au descoperit că fiecare dintre ei avea un pacient cu acest sindrom. Ei au publicat o descriere a sindromului în 1940. Persoanele afectate au o formă de nanism cu membre scurte și prezintă adesea defecte dentare și buzale , precum și polidactilie (degete în plus). Cel mai mare pedigree pentru această afecțiune a fost descris într-o populație Amish de Ordin Vechi din estul Pennsylvaniei de către Victor McKusick și colegii săi (1964). În acea comunitate, aproximativ 5 din 1.000 de nașteri sunt afectate , iar în populația totală de 8.000, frecvența observată este de 2 la 1.000. Toate persoanele afectate au părinți neafectați , iar genealogia tuturor cazurilor afectate își poate urmări originea până la Samuel King și soția sa, care au sosit în zonă în 1774. Nici King , nici soția sa nu sunt cunoscuți ca fiind afectați de boală. Nu există cazuri ale acestei boli în alte comunități Amish, cum ar fi cele din Ohio sau Indiana .
    (a) Pe baza acestor informații, deduceți cel mai probabil mod de transmitere a acestei boli. Folosind legea Hardy-Weinberg , calculați frecvența alelei mutante în populație și frecvența heterozigoților , presupunând condițiile Hardy -Weinberg.
    (b) Care este cea mai probabilă explicație pentru frecvența ridicată a acestei boli în comunitatea Amish din Pennsylvania și absența sa în alte comunități Amish?
27. Sursa originală de noi alele asupra cărora operează selecția este mutația , un eveniment aleatoriu care apare independent de valoarea selectivă pe care mutația o are pentru organism. Deși multe organisme model au fost utilizate pentru a studia evenimentele mutaționale în populații , unii cercetători au dezvoltat modele moleculare abiotice . Solí (2006) a examinat un astfel de model pentru a studia relațiile dintre mutațiile dăunătoare și avantajoase și dimensiunea populației într-o moleculă de ARN ligază (ribozim). Solí a descoperit că, cu cât populația de molecule este mai mică , cu atât este mai probabil ca nu doar mutațiile dăunătoare, ci și cele avantajoase să dispară. De ce ar putea influența dimensiunea populației supraviețuirea ambelor tipuri de mutații (dăunătoare și avantajoase) în cadrul unei populații?
28. O serie de comparații ale secvențelor de nucleotide între hominizi și rozătoare indică faptul că consangvinizarea s-ar fi putut produce mai mult printre strămoșii hominizilor decât printre cei ai rozătoarelor. Atunci când a apărut un blocaj populațional de aproximativ 10.000 de indivizi , Knight (2005) și Bakewell (2007) sugerează că acest lucru ar fi putut oferi primilor oameni o probabilitate mai mare de a dezvolta boli genetice. De ce ar putea influența un blocaj populațional frecvența bolilor genetice?
29. Două secvențe omoloage ale lanțurilor *α* și β ale hemoglobinei umane sunt prezentate mai jos . Consultați dicționarul codului genetic (Figura 13.7) și determinați câte substituții de aminoacizi ar fi putut apărea ca urmare a substituției unui singur nucleotid. Pentru toate cele care nu pot apărea ca urmare a unei singure modificări, determinați distanța minimă de mutație.

o: Aripă	Val	Către	Lui	Val	Aspidă	Aspidă	Met	Pro
P- Glicol	Leu	Către	Lui	Leu	Aspidă	Măgar	Leu	Lys

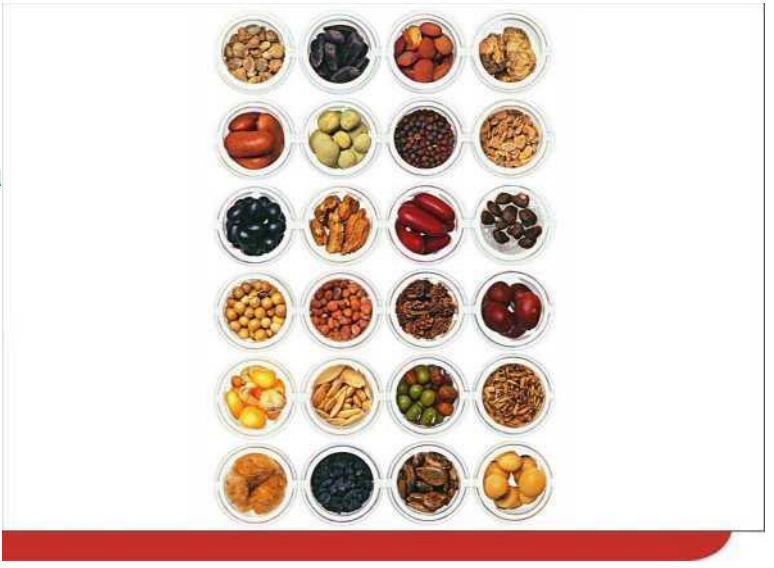
30. Determinați distanțele mutaționale minime dintre aceste secvențe de aminoacizi ai citocromului c pentru mai multe organisme. Comparați distanțele dintre oameni și fiecare dintre organisme .

Uman:	Lys	Glu	Glu	Arg	Ala	Aspidă
Cabal:	Lys	Trecerea	Glu	Arg	Glu	Aspidă
Cerdo:	Lys	Glicol	Glu	Arg	Glu	Aspidă
Câine:	Trecerea	Glicol	Glu	Arg	Glu	Aspidă
Gallină:	Lys	Ser	Glu	Arg	Val	Aspidă
Rana toro:	Lys	Glicol	Glu	Arg	Glu	Aspidă
Hongo:	Ala	Lys	Aspidă	Arg	Asn	Aspidă

31. Reconstituirile recente ale istoriei evoluției se bazează adesea pe atribuirea divergenței în termeni de modificări ale secvențelor de aminoacizi sau nucleotide. De exemplu , o comparație a citocromului c arată 10 diferențe de aminoacizi între oameni și câini, 24 de diferențe între oameni și molii și 38 de diferențe între oameni și drojdie. Astfel de date nu oferă informații despre momentele absolute de divergență pentru oameni , câini, molii și drojdie. Cum poate fi calibrat ceasul molecular pentru a obține un ceas de timp absolut ? Ce probleme am putea întâmpina cu o astfel de calibrare?
32. Într -un studiu recent asupra ciclidelor din Lacul Victoria din Africa, Nagl și colab. (1998. *Proc. Nati. Acad. Sci.* (USA) 95:14,238–14,243) au examinat presupusele polimorfisme de secvență neutră la loci genomici necodificatori la 12 specii și la presupușii lor strămoși care locuiesc pe râuri . Același polimorfism a fost găsit la toate loci-urile la aproape toate speciile analizate din Lacul Victoria , atât cele care trăiesc în lacuri, cât și cele care trăiesc pe râuri . Polimorfisme diferite au fost găsite la aceste loci la ciclide din alte lacuri africane .
    (a) De ce am suspecta că există secvențe neutre situate în regiuni genomice necodificatoare ?
    (b) Ce concluzii se pot trage din aceste date privind polimorfismele , în ceea ce privește strămoșii ciclidelor din aceste lacuri?
33. Având în vedere că există aproximativ 400 de specii de ciclide în Lacul Victoria și că acesta a secat aproape complet acum aproximativ 14.000 de ani, ce dovezi indică faptul că a existat o adaptare evolutivă extrem de rapidă, mai degrabă decât o imigrație intensă?
34. Ce modificări genetice au loc în timpul speciației ?
35. Unii critici au avertizat că utilizarea terapiilor genice pentru corectarea tulburărilor genetice va afecta cursul evoluției umane . Evaluați aceste critici în lumina a ceea ce știm despre genetica populațiilor și evoluție , făcând distincția între terapiile genice somatice și terapiile genice germinale .
36. Comparațiile dintre ADN-ul mitocondrial al omenirii de Neanderthal și cel al oamenilor moderni indică faptul că neanderthalienii nu sunt înrudiți cu oamenii moderni și nu au contribuit la moștenirea noastră mitocondrială. Cu toate acestea, acest lucru nu exclude neapărat anumite forme de încrucișare care ar fi putut duce la fondul genetic al europenilor actuali care derivă atât din neanderthalieni , cât și din oamenii timpurii (numiți Cro-Magnoni). Înainte de secvențierea genomului neanderthalian , Caramelli și colab. (2003. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (SUA] 100 : 6593-6597) a analizat secvențe de ADN mitocondrial de la rămășițe de Cro-Magnon vechi de 25.000 de ani (pionieri ai oamenilor moderni, aparținând -speciei noastre) și le -a comparat cu patru specimene de Neanderthal și un set vast de date obținute de la oamenii moderni din prezent. Rezultatele sunt prezentate în grafic .
    Axa x reprezintă vârsta specimenelor în mii de ani; axa y reprezintă distanța genetică medie . Oamenii moderni sunt indicați prin pătrate pline; *oamenii* de Cro -Magnon prin pătrate goale; iar neanderthalienii prin romburi.
    (a) Ce se poate concluziona despre relația dintre Cro -Magnon și europenii moderni? Și despre relația dintre Cro-Magnon și neanderthalieni?
    (b) Pe baza acestor date, pare probabil ca neanderthalienii să fi adus vreo contribuție la fondul genetic al oamenilor de Cro- Magnon sau al europenilor moderni?
    (c) Cum putem reconcilia aceste rezultate cu cele obținute prin compararea secvenței genomice nucleare a neanderthalienilor și a oamenilor moderni?



Semințe criogenice de soiuri rare de plante de la Departamentul Agriculturii al Statelor Unite, Laboratorul Național de Depozitare a Semințelor.



Genetica

26

conservării

CONCEPTE CAPITOL

►► **Speciile au nevoie de diversitate genetică pentru a se adapta și a supraviețui mult timp.**

Populațiile mici și izolate sunt deosebit de vulnerabile la efectele genetice.

►► **Populațiile pe cale de dispariție care își revin ca dimensiune s-ar putea să nu își recapete diversitatea genetică .**

►► **Eforturile de conservare și reproducere se concentrează pe menținerea diversității genetice pentru supraviețuirea pe termen lung a speciilor.**

LA Pe măsură ce secolul XXI avansează, diversitatea vieții de pe Pământ va fi supusă unei presiuni tot mai mari din cauza efectelor directe și indirecte ale creșterii explozive a populațiilor umane. În urmă cu aproximativ 10.000 de ani, *pe planetă trăiau aproximativ 10 milioane de Homo sapiens.* Acest număr a crescut la 100 de milioane acum 2.000 de ani și la 2,5 miliarde până în 1950. Într-o singură generație , populația umană a lumii s-a mai mult decât dublat, ajungând la 5,5 miliarde în 1993 și se preconizează că va ajunge la 19 miliarde până în 2100 (Figura 26.1).

Efectul creșterii rapide a populației umane asupra altor specii a fost semnificativ. Datele din Lista Roșie a Speciilor Amenințate a IUCN din 2010 arată că, la nivel global, 25 % dintre mamifere, 13 % dintre păsări, 41% dintre amfibieni, 33% dintre recifele de corali și 30% dintre conifere sunt amenințate. Datele din Lista Roșie din 2008 arată că 8.400 de specii de plante vasculare din întreaga lume sunt amenințate. Nu doar speciile sălbatice sunt în pericol. Diversitatea genetică a plantelor și animalelor cultivate se pierde și ea, iar multe soiuri tradiționale de culturi și rase de animale dispar . Organizația pentru Alimentație și Agricultură din SUA (FAO) estimează că, din 1900, 75% din diversitatea genetică a plantelor cultivate s-a pierdut. Dintre cele aproximativ 5.000 de rase diferite de animale domestice de fermă din întreaga lume , o treime sunt în pericol de dispariție.

De ce ar trebui să ne intereseze pierderea biodiversității, adică *variația biologică reprezentată de diferite plante și animale!* După cum arată registrul fosil, fără legătură cu influența umană,

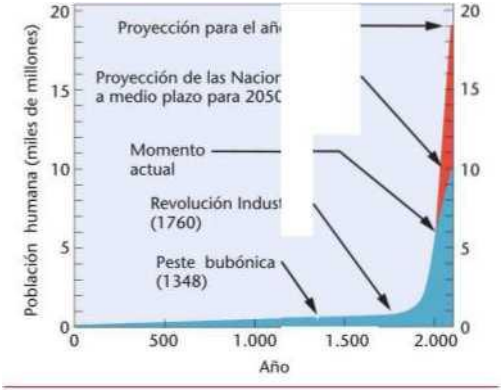


FIGURA 26.1 Creșterea populației umane în ultimii 2000 de ani și proiecție până în 2100.

Multe plante și animale diferite care au locuit cândva planeta au dispărut acum milioane de ani și au fost înlocuite de altele. Cu toate acestea, biologii sunt îngrijorați de rata accelerată de extincție a speciilor la care asistăm în prezent , o extincție care poate fi atribuită impactului direct sau indirect al omenirii . Vânătoarea sau recoltarea deliberată a animalelor și plantelor de către oameni și distrugerea habitatului din cauza activităților umane au redus drastic populațiile multor specii . O problemă suplimentară în multe părți ale lumii este introducerea accidentală sau deliberată de către oameni a unor plante sau animale invazive, non-native, care se hrănesc cu sau concurează cu speciile native , punându-le în pericol și mai mult . De exemplu , șarpele brun de copac , Boiga *irregularis* . (Figura 26.2), a fost transportat accidental cu barca pe insula Guam la sfârșitul anilor 1940. Șarpele brun de copac este un prădător agresiv care a cauzat dispariția a 12 specii de păsări și 4 specii de șopârle native din Guam. Această specie introdusă continuă să amenințe biodiversitatea nativă a insulei .

Totuși , una dintre cele mai semnificative amenințări la adresa biodiversității ar putea fi schimbările climatice cauzate de încălzirea globală. Oamenii de știință sunt din ce în ce mai îngrijorați de faptul că acest fenomen va duce la dispariția multor specii, în special a celor adaptate la viața în medii foarte reci . De exemplu, Lista Roșie IUCN din 2008 include ursul polar ca specie pe cale de dispariție și clasifică restul de 22.000 de urși polari (Figura 26.3) ca fiind vulnerabili , din cauza temerilor că habitatul lor va fi pierdut din cauza încălzirii globale . Un studiu recent realizat de oamenii de știință de la Institutul Oceanografic Woods Hole prezice că pierderea gheții marine va duce la dispariția a 95 % din populațiile de pinguini imperiali până în 2100 .

FIGURA 26.2 Șarpele brun de copac ***(Boiga irregularis).***

FIGURA 26.3 Ursul polar *(Ursus maritimus)*.

Ca urmare a dispariției speciilor , biologii se tem că ecosistemele - rețele complexe *de plante și animale interdependente, dar diverse, care coexistă în același mediu* - Acestea s-ar putea prăbuși dacă se pierde echilibrul care susține speciile . Acest lucru prefigurează posibile consecințe pentru propria noastră supraviețuire pe termen lung. Alți oameni de știință au subliniat că vom pierde un potențial economic nedeterminat de plante și animale neexploatate dacă le permitem să dispară. Uneori, speciile rare se dovedesc a fi extrem de valoroase. De exemplu, o bacterie termofilă, *Thermus aquaticus,* a fost descoperită într-un izvor termal din Parcul Național Yellowstone și se știe că există doar în câteva izvoare - termale din întreaga lume . ADN polimeraza izolată din aceste microorganisme funcționează la temperaturi foarte ridicate și este esențială pentru reacția în lanț a polimerazei (PCR), un proces de replicare *in vitro* a ADN-ului pe care l-am discutat pe parcursul acestei cărți . Această tehnică de cercetare este esențială în industria biotehnologică globală, care valorează miliarde de dolari. Pe lângă beneficiile practice ale biodiversității , oamenii de știință și cei care nu o cunosc, deopotrivă , au îmbrățișat argumentul că viața umană va suferi atât spiritual , cât și estetic dacă nu se străduiește să mențină varietatea fascinantă și adesea frumoasă de organisme vii cu care împărțim planeta.

Biologii specializați în conservare lucrează pentru a înțelege și menține biodiversitatea studiind factorii care duc la declinul speciilor și modalitățile de conservare a acestora. Noul domeniu al geneticii conservării a apărut în ultimii 25 de ani, pe măsură ce oamenii de știință au început să recunoască faptul că genetica va fi un instrument important pentru menținerea și restabilirea viabilității populațiilor . Aplicațiile geneticii în biologia conservării sunt numeroase ; în acest capitol , vom explora câteva dintre ele . La baza rolului din ce în ce mai important al geneticii în biologia conservării se află recunoașterea faptului că biodiversitatea depinde de diversitatea genetică și că menținerea biodiversității pe termen lung este puțin probabilă dacă se pierde diversitatea genetică.

26.1

Diversitatea genetică este scopul geneticii conservării

În timp ce biodiversitatea Cuprinzând variația reprezentată de toate speciile de animale și plante existente pe această planetă la un moment dat, diversitatea genetică nu este ușor de definit și studiat. Diversitatea genetică poate fi considerată la două niveluri: *diversitatea interspecifică* și *diversitatea intraspecifică* .

Diversitatea între specii, sau diversitatea interspecifică , este diversitatea reflectată în numărul de specii diferite de plante și animale prezente într -un ecosistem. Unele ecosisteme au un nivel ridicat de diversitate interspecifică , cum ar fi pădurile tropicale, unde sute de specii diferite de animale și plante pot fi găsite pe o rază de câțiva metri pătrați [Figura 26.4(a)]. Alte ecosisteme, în special cele în care plantele și animalele trebuie să se adapteze la un mediu sărac , pot avea un număr mult mai mic de specii [Figura 26.4 (b)]. Inventarele de specii - liste ale diferitelor specii de animale și plante găsite într-un anumit mediu - sunt utile pentru identificarea punctelor fierbinți de diversitate: zone geografice cu o diversitate interspecifică deosebit de ridicată , unde se poate...

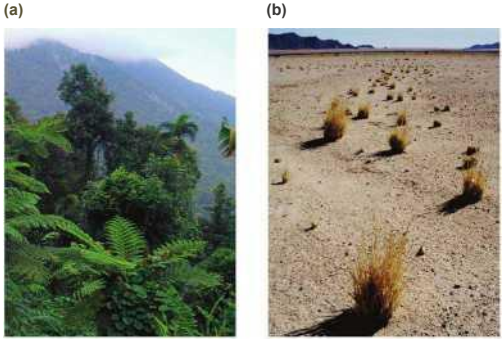


FIGURA 26.4 (a) Un bosque tropical lluvioso es un ecosistema con una elevada diversidad interespecífica, (b) Desierto de Namibia, un país del sur de África.

Concentrați eforturile de conservare. Biologii specializați în conservare, care lucrează la nivel de ecosistem, sunt interesați de prevenirea pierderii speciilor și de restaurarea speciilor care au făcut cândva parte din sistem, dar care nu mai sunt găsite. Introducerea lupului cenușiu *(Canis lupus)* în Parcul Național Yellowstone și eliberarea condorilor din California *(Gymnogyps californianus)* Crescute în captivitate în California, în zone muntoase pe care le-au ocupat anterior în sud-vestul Statelor Unite, sunt exemple ale încercărilor actuale ale biologilor conservatori de a restaura speciile pierdute în ecosistemele lor.

Diversitatea intraspecifică — diversitatea în cadrul unei specii — are două componente: diversitatea intrapopulațională, care este variația genetică care apare *între indivizii* din aceeași populație a unei anumite specii; și diversitatea interpopulațională , care este variația care apare între diferite populații ale aceleiași specii. Variația genetică în cadrul populațiilor poate fi măsurată ca frecvența indivizilor din populație care sunt heterozigoți pentru un anumit locus sau ca numărul de alele diferite la un locus prezente în fondul genetic al populației. Atunci când se utilizează tehnici de profilare ADN , procentul de loci polimorfici — cei reprezentați de diferite benzi în profilurile ADN ale diferiților indivizi — poate fi calculat pentru a indica gradul de diversitate genetică dintr-o populație. La speciile care se fertilizează încrucișat, cea mai mare parte a diversității genetice intraspecifice se găsește la nivel intrapopulațional.

Dacă populațiile sunt separate geografic și nu există migrație sau schimb de gameți între ele, poate apărea o diversitate interpopulațională semnificativă . În mod similar, speciile predominant consangvinizate (cum ar fi plantele autofecundante) tind să aibă niveluri mai ridicate de diversitate interpopulațională decât intrapopulațională. La aceste specii, există un număr limitat de genotipuri dominante în cadrul unei anumite populații, dar o variație mai mare între diferite populații. Înțelegerea sistemelor de împerechere și a distribuției variației genetice la speciile pe cale de dispariție este importantă pentru conservarea lor , nu numai pentru a asigura producția continuă de urmași, ci și pentru a determina cea mai bună strategie pentru menținerea diversității intraspecifice. De exemplu, ar fi mai eficient să se conserveze câteva populații mari decât multe populații diferite, mici? Aceste informații pot fi utilizate pentru a ghida eforturile de conservare și restaurare.

Pierderea diversității genetice

Pierderea diversității genetice la speciile nedomesticite este de obicei asociată cu o reducere a dimensiunii populației. Aceasta se poate datora vânătorii excesive sau colectării excesive. De exemplu, biologii dau vina pe pescuitul comercial excesiv pentru prăbușirea, la începutul anilor 1990, a populațiilor de cod din largul coastei Newfoundland. Aceste populații, cândva cele mai productive zone de pescuit de cod din lume, încă nu și-au revenit, în ciuda faptului că sunt protejate din 1992. Pierderea habitatului este, de asemenea, o cauză majoră a declinului populației . Pe măsură ce populația umană globală crește, tot mai mult teren este folosit pentru locuințe și sisteme de transport sau pentru producția agricolă, reducând sau eliminând zonele cândva locuite de animale și plante sălbatice. Reducerea habitatelor disponibile reduce populațiile de specii sălbatice și adesea le izolează unele de altele, cum ar fi populațiile prinse în zone de teren neexploatate înconjurate de zone utilizate pentru agricultură, dezvoltare urbană sau alte utilizări umane. Acest proces este cunoscut sub numele de fragmentare a populației. Atunci când populațiile nu mai sunt în contact, fluxul de gene - *schimbul treptat de alele între două populații prin migrație sau schimb de gameți - este perturbat.* și un mecanism important pentru menținerea variației genetice se pierde .

La speciile domestice, pierderea diversității genetice nu este de obicei rezultatul pierderii habitatului sau al declinului populației; există un risc mic ca vacile sau porumbul să dispară ca specii în viitorul apropiat. Reducerea diversității speciilor domestice poate fi atribuită schimbărilor în practicile agricole și cerințelor consumatorilor . Tehnicile agricole moderne au crescut considerabil nivelurile de producție, dar au dus și la o mai mare uniformitate genetică. Atunci când fermierii trec la o nouă varietate de culturi sau la o rasă îmbunătățită de animale la scară largă, aceștia abandonează cultivarea multor tipuri locale , care pot dispărea dacă nu se depun eforturi pentru a le conserva.

De exemplu, Seed Exchange Networks, o organizație care lucrează pentru conservarea soiurilor de fructe și legume tradiționale, relatează că în 1904, W. H. Ragan, un om de știință din cadrul Departamentului Agriculturii din SUA , a înregistrat un total de 7.098 de soiuri de mere în America de Nord. Mai puțin de 14% dintre aceste soiuri pot fi găsite astăzi, doar 15 soiuri reprezentând 90 % din merele vândute în magazinele alimentare din SUA . Soiurile moderne pot fi mai bine adaptate pentru producția agricolă , dar soiurile mai vechi conțin gene utile care pot juca un rol critic în funcțiile de supraviețuire , cum ar fi rezistența la boli, frig sau secetă.

Identificarea diversității genetice

Timp de mulți ani, geneticienii populațiilor și-au bazat estimările diversității intraspecifice pe diferențele fenotipice dintre indivizi, cum ar fi diferențele de culoare a semințelor sau a florilor sau diferențele de marcaje (Figura 26.5). Analiza ADN-ului este o tehnică moleculară directă, mai modernă, pentru detectarea și cuantificarea diferențelor genetice dintre indivizi. Această tehnică a devenit un instrument important pentru evaluarea variației genetice interpopulaționale și intrapopulaționale. ADN-ul nuclear, mitocondrial și cloroplastic poate fi analizat pentru a determina nivelurile de variație genetică. În Capitolul 20, am descris aplicațiile tehnicilor de analiză a ADN-ului utilizând enzime de restricție sau reacții PCR. Biologii conservatori au folosit tehnici similare pentru a examina nivelurile și distribuția variației genetice atât în cadrul populațiilor, cât și între acestea și, ulterior, pentru a ghida eforturile de conservare.

O tehnică utilizată pe scară largă în analiza diversității genetice a populațiilor de plante și animale profită de prezența în genom a STR-urilor (short tandem repeats - repetiții scurte în tandem), numite și microsateliți, pe care le-am prezentat în Capitolul 12. STR-urile constau din secvențe scurte de ADN (de la două la nouă baze) repetate de un număr variabil de ori și găsite în tot genomul. Numărul de repetiții la un anumit locus STR variază adesea de la un individ la altul. Această variație este detectată prin secvențierea regiunilor de ADN situate de o parte și de alta a locusului STR și apoi crearea de primeri de ADN monocatenari complementari acestor secvențe flancante, care se vor hibridiza selectiv .

FIGURA 26.5 Variabilitatea fenotipică a culorii și petelor semințelor la fasolea comună *(Phaseolus vulgaris)* relevă un grad ridicat de diversitate intraspecifică.

în timpul reacției în lanț a polimerazei (PCR), care a fost explicată în detaliu în Capitolul 20. Aceasta permite amplificarea țintită a regiunilor microsatelite, astfel încât acestea să poată fi analizate și să se poată determina numărul de repetiții . Deși regiunile STR în sine nu conțin gene exprimate, biologii specializați în conservare pot utiliza variația microsateliților între indivizii dintr-o populație ca o estimare indirectă a cantității de variație genetică generală prezentă.

De exemplu, cercetătorii de la Universitatea din Arizona au folosit analiza microsateliților pentru a compara variația genetică în cele trei populații rămase de sabia argintie Mauna Loa *(Argyoxiphium sandwishense)*. O plantă pe cale de dispariție , găsită doar în Hawaii . Biologii care lucrau la conservarea sa trebuiau să știe dacă să încerce să crească diversitatea genetică prin redistribuirea semințelor între populații . Cu toate acestea, analizele STR nu numai că au relevat cantități neașteptate de diversitate încă prezentă în cadrul populațiilor, dar au arătat și că cele trei populații erau destul de diferite una de cealaltă din punct de vedere genetic . Planul de redistribuire a semințelor a fost abandonat în favoarea conservării identității unice a fiecărei populații.

O altă aplicație a markerilor ADN, cum ar fi microsateliții , în conservare implică obținerea *amprentelor genetice bazate pe PCR* . Utilizarea tehnicilor de amprentare genetică în știința criminalistică a fost explicată în Capitolul 22. Tehnici similare pot fi utilizate pentru a detecta comerțul ilegal cu specii de plante și animale pe cale de dispariție, care sunt protejate prin lege. De exemplu , deși comerțul internațional cu fildeș este ilegal , braconajul de elefanți africani și contrabanda cu fildeș continuă să genereze milioane de dolari. Pentru a determina originea fildeșului găsit într -un compartiment secret al unui container maritim în Hong Kong în 2008, un grup internațional de cercetători a folosit markeri - microsateliți pentru a analiza ADN-ul extras din fildeșul confiscat. Aceștia au comparat acest profil microsatelit cu peste 600 de probe de ADN de referință obținute din excrementele populațiilor de elefanți sălbatici din Africa și au stabilit că se potrivea cu cel al elefanților de pădure din sudul Gabonului . Această descoperire a oferit un indiciu cheie despre rețelele de braconaj, care vor ajuta la combaterea acestui comerț ilegal.

Comerțul ilegal cu produse de origine animală are loc și în Statele Unite . Un studiu recent realizat de oamenii de știință de la Universitatea din Florida, amplificarea secvențelor de ADNmt din carnea de broască țestoasă vândută în Louisiana și Florida, a arătat că un sfert din probe proveneau de fapt de la aligatori, nu de la broaște țestoase. O mare parte din probele rămase proveneau de la broaște țestoase mici de apă dulce ,

ceea ce indică faptul că populațiile de broaște țestoase de apă dulce erau în scădere din cauza pescuitului excesiv și, prin urmare, aveau nevoie de protecție. Îmbunătățirile ulterioare ale tehnicilor de extracție a ADN-ului și de profilare au permis identificarea precisă a ouălor de broască țestoasă marină gătite și servite în restaurante, permițând urmărirea penală a celor responsabili de pescuitul ilegal.

Noile metode de analiză a datelor markerilor ADN permit, de asemenea, cercetătorilor să estimeze schimbările populației din trecut, pe baza ratei la care se știe că ADN-ul mitocondrial acumulează mutații punctuale spontane. Într-un studiu recent și controversat, o echipă de oameni de știință de la Universitatea Stanford, condusă de Dr. Stephen Palumbi, a măsurat diversitatea secvențelor în puncte cheie din ADN-ul mitocondrial al balenelor cu cocoașă și a comparat descoperirile lor cu cantitatea de diversitate așteptată de la dimensiunea populației lor. Cercetătorii de la Stanford au descoperit o diversitate a secvențelor ADN-ului mitocondrial mult mai mare decât se aștepta și au concluzionat că, înainte ca vânătorii de balene să le ducă aproape la dispariție în secolele al XIX-lea și al XX-lea, populația totală de balene cu cocoașă trebuie să fi fost de peste un milion - de zece ori mai mare decât estimările istorice bazate pe înregistrările vânătorilor de balene. Întrucât acordurile internaționale actuale vor permite reluarea vânătorii de balene odată ce populațiile își vor reveni la 54% din dimensiunea inițială estimată, descoperirile lui Palumbi sunt importante pentru gestionarea viitoare a acestei specii.

26.2

Mărimea populației are un impact semnificativ asupra supraviețuirii speciilor

Unele specii nu au fost niciodată numeroase, în special cele adaptate să supraviețuiască în medii neobișnuite. Biologii clasifică astfel de specii drept *rare din punct de vedere natural*. Pe *de* altă parte, *speciile recent rare* sunt cele al căror număr a scăzut din cauza unor presiuni precum pierderea habitatului. Populațiile unor astfel de - specii pot fi nu numai mici, ci și fragmentate și izolate de alte populații. Atât scăderea dimensiunii populației , cât și izolarea crescută au consecințe genetice importante , ducând la un risc mai mare de pierdere a biodiversității .

Cât de mică trebuie să fie o populație pentru a fi considerată amenințată? Răspunsul depinde, într-o oarecare măsură, de specie, dar populațiile mici pot deveni ușor vulnerabile la fenomene genetice care cresc riscul de dispariție. În general, o populație de mai puțin de 100 de indivizi este considerată extrem de sensibilă la aceste probleme, care includ deriva genetică, consangvinitatea și fluxul genetic redus . Efectele unor astfel de probleme asupra supraviețuirii speciilor sunt substanțiale. De exemplu, studiile efectuate asupra oilor canadiene Bighorn au arătat că populațiile de mai puțin de 50 de indivizi sunt foarte susceptibile de a dispărea în aproximativ 50 de ani. Proiecțiile bazate pe modele matematice arată că, pentru toate speciile, populațiile de mai puțin de 10.000 de indivizi sunt susceptibile de a avea limitări în ceea ce privește variația genetică adaptivă și că o populație trebuie să aibă cel puțin 100.000 de indivizi pentru a fi sustenabilă pe termen lung.

Sarcina de a determina numărul de indivizi pe care o populație trebuie să îi aibă pentru a fi sustenabilă pe termen lung este complicată de faptul că nu toți membrii unei populații au o probabilitate egală de a produce urmași: unii vor fi sterili, alții tineri sau prea bătrâni. *Mărimea efectivă a populației (N _e) este* definită ca numărul de indivizi dintr-o populație care au o probabilitate egală de a contribui cu gameți la următoarea generație. *N _e este* aproape întotdeauna mai mică decât *mărimea absolută a populației (N).* Mărimea efectivă a populației poate fi calculată în mai multe moduri, în funcție de factorii care împiedică toți indivizii din populație să contribuie în mod egal la următoarea generație. De exemplu, în populațiile care se reproduc sexuat cu un număr diferit de masculi și femele, mărimea efectivă a populației se calculează ca

$$N_e = \frac{4(N_m N_f)}{N_m + N_f}$$

unde *Nm este* numărul de bărbați, iar Nf este numărul de femei din populație. Prin urmare, o populație de 100 de bărbați și 100 de femei ar avea o dimensiune efectivă de 4(100 X 100)/ (100 + 100) = 200. Invers , dacă ar exista 180 de bărbați și doar 20 de femei, dimensiunea efectivă a populației ar fi 4(180 X 20)/(180 + 20) = 72.

Mărimea efectivă a populației este influențată și de fluctuațiile mărimii absolute a populației de la o generație la alta. În acest caz, mărimea efectivă a populației este media armonică a valorilor pentru fiecare generație, astfel

$$N_e = 1 \Big/ \frac{1}{t}\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} + \cdots + \frac{1}{N_t}\right)$$

unde *t* este numărul total de generații luate în considerare. De exemplu, dacă o populație are o reducere temporară a dimensiunii sale în generația 2, astfel încât $N_1 = 100$, $N_2 = 10$ și $N_3 = 100$, atunci

$$N = 1 \Big/ \frac{1}{3}\left(\frac{1}{100} + \frac{1}{10} + \frac{1}{100}\right) = 0{,}04$$

În acest caz, deși numărul mediu real de indivizi din populație pe parcursul a trei generații este de 70, dimensiunea efectivă a populației în acea perioadă a fost de doar 25. O reducere temporară drastică a dimensiunii, cum este aceasta, este cunoscută sub numele de blocaj populațional. Blocajele apar atunci când o populație sau o specie este redusă la doar câțiva indivizi reproducători, ai căror urmași vor crește apoi ca număr în generațiile următoare pentru a restabili populația. Deși numărul de indivizi poate fi readus la niveluri mai sănătoase, diversitatea genetică a populației nou extinse este adesea redusă drastic, deoarece gameții puținilor indivizi care au supraviețuit și au acționat ca părinți reprezintă doar un subset al fondului genetic original.

ACUM REZOLVĂ ASTA

26.1 o populație amenințată de gorile de câmpie aflate în sălbăticie . Biologii numără 15 gorile, dar observă că populația este formată din două haremuri, fiecare dominat de un mascul diferit. Un harem are opt femele , *iar* celălalt are cinci. Care este dimensiunea efectivă a populației de gorile?

- **SUGESTIE:** *Această întrebare ne cere să calculăm dimensiunea efectivă a populației N _e a unei populații de gorile amenințate. Cheia rezolvării acestei probleme este de a lua în considerare ce caracteristică neobișnuită a structurii sociale a populației de gorile va afecta valoarea lui N _r.*

Programele de reproducere în captivitate, în care câțiva indivizi din speciile amenințate sunt separați din sălbăticie, iar urmașii lor sunt crescuți într-un mediu protejat pentru a restabili populația , duc inevitabil la blocaje populaționale. Blocajele apar și în mod natural atunci când un număr mic de indivizi dintr-o populație migrează pentru a stabili o nouă populație în altă parte. Atunci când o nouă populație derivată dintr-un subgrup mic de indivizi are o diversitate genetică semnificativ mai mică decât populația originală, apare un efect fondator (Capitolul 25). Nivelurile reduse de diversitate genetică datorate unui efect fondator pot persista timp de mai multe generații, așa cum demonstrează studiile efectuate pe două specii de foci cu blană antarctice, *Arctocephalus gazella* și *Arctocephalus tropicalii.* Vânătorii de foci din secolele al XVIII-lea și al XIX-lea au redus drastic populațiile acestor specii, eliminându-le din anumite zone ale habitatului lor natural din Oceanul de Sud ‡‡‡‡‡‡.

Deși numărul focilor cu blană din Antarctica a crescut și ambele specii au recolonizat o mare parte din habitatul lor original, amprenta genetică a ADN-ului mitocondrial arată că un efect fondator persistă încă la A. *gazella,* cu variație genetică redusă în populațiile actuale descendente din grupul de indivizi care au supraviețuit.

Ghepardul *(Acinonyx* jubatus *),* prezentat în Figura 26.6, este un alt exemplu bine studiat de specie cu variație genetică redusă ca urmare a cel puțin unei blocaje severe a populației care a apărut în istoria sa recentă . Aloenzimele studiate în populațiile de gheparzi din Africa de Sud au arătat niveluri de variație genetică mai mici de 10 % din cele găsite la alte mamifere. Se crede că sperma anormală și ratele de reproducere scăzute observate de obicei la gheparzi reflectă această lipsă de diversitate genetică , deși încă nu este clar cum și când a apărut blocajul la această specie.

26.3

Efectele genetice sunt mai pronunțate în populațiile mici și izolate

Populațiile mici, izolate, cum ar fi cele întâlnite la speciile amenințate și pe cale de dispariție sau cele rezultate din fragmentarea populației, sunt deosebit de vulnerabile la derivă genetică, consangvinizare și flux genetic redus . Aceste fenomene acționează asupra fondului genetic în moduri diferite, dar în cele din urmă au efecte similare, prin faptul că toate ...

FIGURA 26.6 Ghepardul *(Acinonyx jubatus).*

‡‡‡‡‡‡În anul 2000 , acest al cincilea ocean mondial a fost delimitat de oceanografi, incluzând părțile sudice ale oceanelor Atlantic, Indian și Pacific .

Acestea pot reduce diversitatea genetică și viabilitatea pe termen lung a speciei.

Deriva genetică

Dacă numărul de indivizi care se împerechează într-o populație este mic, următoarea generație va fi formată din puțini gameți. Alelele purtate de acești gameți pot să nu fie reprezentative pentru toți cei prezenți în populație ; pur și simplu, din întâmplare, unele alele pot fi subreprezentate sau pot lipsi cu totul, ceea ce duce la modificări ale frecvențelor alelelor în timp, rezultând în derivă genetică. Acest fenomen a fost deja descris în Capitolul 25. O consecință gravă a derivei genetice în populațiile cu o dimensiune efectivă mică a populației este pierderea variației genetice. Deriva genetică este un proces aleatoriu, astfel încât atât alelele dăunătoare, cât și cele avantajoase se pot pierde într-o populație mică. Cu alte cuvinte, o alelă utilă se poate pierde chiar dacă are potențialul de a crește adaptabilitatea sau adaptabilitatea pe termen lung. Probabilitatea ca o alelă să se fixeze prin derivă este egală cu frecvența sa inițială. Prin urmare, dacă un locus are două alele, A și ★, și dacă frecvența inițială a lui A este 0,8, atunci probabilitatea ca A să fie fixat este egală cu 0,8, sau 80%, iar probabilitatea ca A să fie pierdut din cauza derivei este 0,2 , sau 20%. Figura 26.7 prezintă un grafic al efectului derivei genetice într-o populație teoretică.

Endogamie

În populațiile mici, probabilitatea consangvinității (împerecherea între indivizi strâns înrudiți) este mai mare. Așa cum este descris în Capitolul 25,

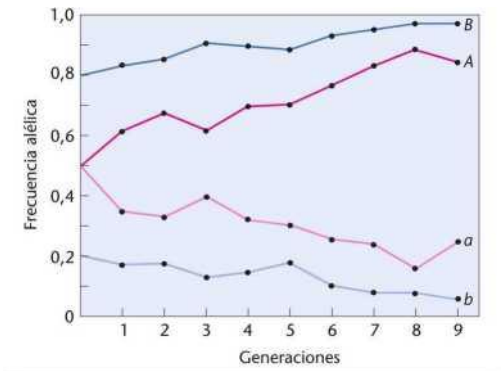


FIGURA 26.7 Variația frecvenței pe parcursul a zece generații pentru două seturi de alele, *A/a* și *B/b*, într-o populație teoretică supusă derivei genetice.

Consangvinitatea crește proporția de indivizi homozigoți din populație, crescând astfel posibilitatea ca un individ să fie homozigot pentru o alelă dăunătoare. Am văzut deja în Capitolul 25 cum poate fi cuantificat gradul de consangvinitate într-o populație folosind coeficientul de consangvinitate (F), care măsoară probabilitatea ca două alele ale unei anumite gene să derive dintr-o alelă ancestrală comună. Reamintim că *coeficientul de consangvinitate este invers proporțional cu frecvența indivizilor - heterozigoți din populație* și poate fi calculat ca

$$F = \frac{2pq - H}{2pq}$$

unde *2pq* este frecvența așteptată a indivizilor heterozigoți pe baza legii Hardy-Weinberg, iar *H* este frecvența reală a heterozigoților din populație.

populație în declin care a devenit suficient de mică pentru a se produce drift, heterozigoția (H) va scădea cu fiecare generație. Cu cât dimensiunea efectivă a populației este mai mică, cu atât H va scădea mai rapid, ducând la o creștere a lui *F,* așa cum se poate observa din ecuație.

$$H_t/H_0 = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t$$

unde H_{sau} este frecvența inițială a heterozigoților , *H* este frecvența heterozigoților după *t* generații , iar *Nc* este dimensiunea efectivă a populației. Figura 26.8 compară ratele de creștere a lui *F* pentru diferite dimensiuni efective ale populației.

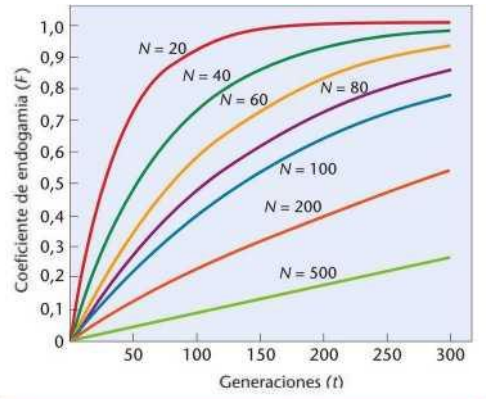


FIGURA 26.8 Creșterea coeficientului de consangvinizare (F) în populațiile teoretice pe măsură ce dimensiunea populației (*N)* scade .

ACUM REZOLVĂ ASTA

26.2 Un biolog naturalist a studiat patru generații ale unei populații de șacali etiopieni rari. Când a început studiul, existau 47 de șacali în populație, iar analiza loci microsateliților acestor animale a arătat o frecvență heterozigotă de 0,55 . În a doua generație, o boală a apărut în populație și doar 17 animale au supraviețuit până la vârsta adultă . Acești șacali au avut 20 de urmași, care la rândul lor au dat naștere la 35 de urmași în a patra generație.

- **(a) Care a fost mărimea efectivă a populației acestor patru generații studiate?**
- **(b) Pe baza acestei dimensiuni efective a populației, care este frecvența animalelor heterozigote în populația de șacali în a patra generație ?**
- **(c) Care este coeficientul de consanguinitate în a patra generație, presupunând un coeficient de consanguinitate F = 0 la începutul studiului, nicio modificare a frecvențelor alele ale microsateliților din fondul genetic și împerechere aleatorie în toate generațiile?**

■ **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să calculăm dimensiunile efective ale populației, frecvența animalelor heterozigote și un coeficient de consanguinitate pentru o populație de șacali care a fost decimată și apoi recuperată. Cheia rezolvării acestei probleme este de a calcula mai întâi N_e (dimensiunea efectivă a populației) pentru fiecare generație și de a ne aminti că frecvența animalelor heterozigote și coeficientul de consanguinitate sunt invers proporționale.*

Ce efecte are consangvinitatea asupra supraviețuirii pe termen lung a unei specii? Dacă numărul de indivizi dintr-o specie rămâne ridicat, consangvinitatea în cadrul unei singure populații poate să nu reducă imediat cantitatea de variație prezentă în fondul genetic general. De exemplu, plantele autopolenizante prezintă adesea niveluri ridicate de homozigoție și o variație genetică relativ mică în cadrul unei populații. Cu toate acestea, ele tind să aibă o variație genetică considerabilă între *diferite populații,* fiecare adaptată la condiții locale de mediu ușor diferite. Pe de altă parte, la multe specii care se fertilizează încrucișat (cele în care fluxul genetic are loc liber între populații), inclusiv mamiferele, consangvinitatea este asociată cu o adaptabilitate redusă și rate de supraviețuire mai mici în rândul urmașilor. Această **depresie prin consangvinizare** poate rezulta din creșterea homozigoției pentru alelele dăunătoare. Numărul de alele dăunătoare prezente în **fondul genetic al unei populații** se numește **povară genetică** (sau *încărcătură genetică).*

La unele specii, consangvinitatea însoțită de selecție împotriva indivizilor homozigoți pentru alele dăunătoare mai puțin potrivite are ca rezultat eliminarea acestor alele din fondul genetic, un proces cunoscut sub numele de *epurarea balastului genetic.* Speciile care și-au eliminat cu succes povara genetică nu prezintă un declin continuu al capacității biologice , chiar și după multe generații de consangvinizare. Acest lucru este valabil la numeroase specii domestice , în special la plantele autopolenizatoare, cum ar fi grâul. Cu toate acestea, experimentele de simulare pe computer au arătat că procesul complet de epurare poate dura 50 de generații sau mai mult, în această perioadă apărând depresia consangvinității .

Alternativ, depresia consangvină poate rezulta din faptul că indivizii heterozigoți au un nivel de fitness mai ridicat decât oricare dintre cei doi indivizi homozigoți. În acest caz, supraviețuirea pe termen lung a populației necesită evitarea consangvinizării și menținerea nivelurilor tuturor alelelor din fondul genetic . Aceste două cerințe pot fi dificil de îndeplinit la speciile care au cunoscut deja o reducere semnificativă a dimensiunii populației.

Efectele depresiei consangvinității și pierderea variației genetice în populații mici și izolate au fost documentate în cazul lupilor cenușii de pe Insula Royale (Figura 26.9). În jurul anului 1950, o pereche de lupi cenușii a traversat aparent un pod de gheață de pe continentul canadian până la Insula Royale din Lacul Superior. Nu existau alți lupi pe insulă, ci o populație mare de elani, care au devenit principala sursă de hrană a lupilor . Până în 1980, populația de lupi de pe Insula Royale crescuse la aproximativ 50 de indivizi. Cu toate acestea , în deceniul următor , numărul de lupi a scăzut la mai puțin de o duzină, fără a se naște noi cuiburi, în ciuda hranei abundente și a niciunui semn aparent de boală. Variația genetică a lupilor rămași a fost examinată prin analizarea ADN-ului mitocondrial și a altor materiale genetice .

FIGURA 26.9 Lupul cenușiu de pe Insula Royale *(Canis lupus).*

Amprenta ADN-ului nuclear a relevat că lupii de pe Isla Royale aveau niveluri de homozigoție de două ori mai mari decât cei dintr - o populație continentală din apropiere . În plus, toți lupii aveau același genotip de ADNmt , ceea ce este în concordanță cu descendența lor dintr-o singură femelă. Prin urmare, gradul de înrudire dintre lupii de pe Isla Royale a fost echivalent cu cel al fraților deplini. Aceste descoperiri au sugerat că eșecul reproductiv al lupilor s-a datorat depresiei prin consangvinitate, un fenomen observat și la populațiile de lupi captivi .

Reducerea fluxului genetic

Fluxul genetic , descris anterior ca schimbul treptat de alele între populații, se realizează prin dispersarea gameților sau migrarea indivizilor . Este un mecanism important pentru introducerea de noi alele într-un fond genetic și creșterea variației genetice. Migrația - este principala cale a fluxului genetic la animale; în Capitolul 25, am examinat efectul migrației și al fluxului genetic asupra frecvențelor alelelor populației. La plante, fluxul genetic nu are loc prin mișcarea indivizilor, ci mai degrabă ca o consecință a polenizării încrucișate între diferite populații și prin dispersarea semințelor. Izolarea și - fragmentarea populațiilor la speciile rare și în declin reduc semnificativ fluxul genetic și potențialul acestuia de a menține diversitatea genetică . După cum am menționat deja, pierderea habitatului este cea mai mare amenințare la adresa supraviețuirii speciilor. Nu este neobișnuit ca speciile amenințate sau pe cale de dispariție să fie restricționate la mici , izolate, zone de habitat rezidual. Acest lucru izolează și fragmentează populațiile supraviețuitoare în așa fel încât deplasarea indivizilor între ele nu poate avea loc , împiedicând astfel fluxul genetic.

Termenul „metapopulație" descrie o *populație formată din subpopulații separate spațial, cu flux genetic limitat, în special dacă* în timp au loc extincții locale și înlocuiri ale unor subpopulații . O metapopulație bine studiată este cea a ciocănitorii cu coroană roșie *(Picoides bo realis), o specie pe cale* de dispariție . (Figura 26.10), care a fost cândva o specie comună în pădurile de pin din sud - estul Statelor Unite. Pierderea habitatului din cauza exploatării forestiere a redus populațiile acestei păsări la locații mici, izolate și împrăștiate , practic fără migrație între ele. Studiile care utilizează aloenzime și profiluri ADN arată că cele mai mici populații de ciocănitoare supraviețuitoare (unde $N \ll 100$) au suferit cea mai mare pierdere de diversitate genetică și prezintă un risc ridicat de depresie consangvină , comparativ cu populațiile mai mari din

FIGURA 26.10 Ciocănitoarea cu coroană roșie ***(Picoides borealis).***

că $N > 100$. În prezent , eforturile de conservare a ciocănitorii includ proiecte de creștere a diversității genetice a populațiilor mai mici prin introducerea de păsări din diferite populații mai mari pentru a recrea artificial fluxul genetic prin migrație care ar fi avut loc în distribuția originală, nefragmentată a speciei .

O altă specie la care au fost studiate efectele fluxului genetic redus este ursul brun nord-american , * *Ursus arctos** . O echipă de cercetători canadieni și americani a măsurat heterozigoția în diferite populații de urși bruni , folosind markeri microsateliți amplificați pentru a crea profiluri ADN pentru urși individuali. Cercetătorii au descoperit că nivelurile de heterozigoție în populația de urși bruni care trăiește în și în jurul Parcului Național Yellowstone erau doar două treimi din valoarea corespunzătoare pentru populațiile de urși bruni care locuiesc în Canada și Alaska continentală. Cercetătorii au concluzionat că acest lucru se datora izolării și migrației reduse a urșilor din Parcul Național Yellowstone. Habitatul populațiilor de urși din Canada și Alaska era mult mai puțin fragmentat, permițând migrația indivizilor și fluxul genetic rezultat între populații. Cercetătorii au examinat, de asemenea, o populație insulară de urși bruni situată în Arhipelagul Kodiak, în largul coastei Alaskăi. Aici, heterozigoția a fost...

chiar mai mică — mai puțin de jumătate din cea a populațiilor de pe continent —, oferind dovezi suplimentare ale efectului pe care dimensiunea mică a populației, migrația restricționată și fluxul genetic restricționat îl au asupra reducerii diversității genetice.

26,4

Eroziunea genetică amenință supraviețuirea speciilor

Pierderea diversității genetice de către o populație sau specie se numește eroziune genetică. De ce este important dacă o populație își pierde diversitatea genetică, mai ales dacă numărul de indivizi rămâne ridicat? Eroziunea genetică are două efecte importante asupra unei populații. În primul rând, poate duce la pierderea alelelor potențial utile din fondul genetic, reducând astfel capacitatea populației de a se adapta la condițiile de mediu în schimbare și crescând riscul de dispariție. Cu câteva decenii înainte de apariția geneticii moderne , Charles Darwin a recunoscut importanța diversității pentru supraviețuirea pe termen lung și succesul evolutiv al speciilor. În *lucrarea sa „Originea speciilor* ” (1859), Darwin a scris:

> *„Cu cât urmașii oricărei specii sunt mai diverși ... cu atât vor fi mai capabili să profite de numeroasele locuri extrem de diversificate din comunitatea naturală și, astfel, să crească în număr. ”*

diversității alele pentru supraviețuirea populațiilor de specii amenințate în condiții de mediu în schimbare poate fi intuită , această intuiție a fost demonstrată la mai multe specii de buruieni ale căror gene conțin alele ce conferă rezistență la erbicidele chimice. Dacă aceste buruieni nu sunt pulverizate, plantele cu aceste alele de rezistență nu se bucură de niciun avantaj selectiv specific, iar alela de rezistență persistă de obicei la o frecvență relativ scăzută. Cu toate acestea, dacă se aplică erbicid, indivizii care poartă alela de rezistență au o probabilitate mult mai mare de a supraviețui și de a genera o nouă populație rezistentă la erbicide, în timp ce populațiile ale căror gene nu au alela de rezistență vor fi eliminate.

Al doilea efect important al eroziunii genetice este reducerea nivelurilor de heterozigoție . La nivel populațional, heterozigoția redusă se va reflecta într-un număr crescut de indivizi homozigoți pentru un anumit locus. La nivel individual, va exista o scădere a numărului de loci heterozigoți în cadrul genotipului unei anumite plante sau animal. După cum am văzut deja, pierderea heterozigoției este o consecință frecventă a dimensiunii mici a populației . Alelele pot fi pierdute prin derivă genetică sau pentru că indivizii care le poartă mor fără a se reproduce. Populațiile mici cresc, de asemenea, probabilitatea de consangvinizare , ceea ce crește inevitabil homozigoția .

Evident, odată ce o alelă dispare dintr -un fond genetic , heterozigoția potențială este redusă considerabil. Dacă inițial existau doar două alele la un anumit locus, pierderea uneia dintre ele înseamnă că heterozigoția este complet eliminată la acel locus , iar cealaltă alelă devine fixă. Nivelul de homozigoție care poate fi tolerat variază în funcție de specie . Studiile asupra populațiilor cu niveluri de homozigoție mai mari decât cele normale demonstrează o serie de efecte dăunătoare, cum ar fi viabilitatea redusă a spermatozoizilor și anomalii reproductive la leii africani, creșterea mortalității la puii de elefant de mare și succesul redus al cuibării la ciocănitori .

studiile de teren nu au furnizat dovezi concludente care să lege dispariția unei populații sălbatice de eroziunea genetică . Cu toate acestea , studiile de laborator care au utilizat *Drosophila melanogaster* Modelele evenimentelor evolutive demonstrează că pierderea variației genetice reduce capacitatea unei populații de a se adapta la schimbările condițiilor de mediu . Muștele de fructe , cu dimensiunile lor mici și timpul scurt de generație de doar 10 până la 14 zile , sunt organisme model utile pentru studierea evenimentelor evolutive , în special pentru că populațiile mari pot fi obținute și menținute cu ușurință timp de mai multe generații.

Într-o serie de experimente efectuate de oamenii de știință de la Universitatea Macquarie din *Sydney* , Australia , populațiile de Drosophila Populațiile au fost reduse la o singură pereche timp de trei generații pentru a simula blocajele populaționale și apoi au fost lăsate să crească numeric. Capacitatea populațiilor cu blocaj de a tolera niveluri crescute de clorură de sodiu a fost comparată cu cea a populațiilor normale, neconsangvinizate . Cercetătorii au descoperit că populațiile cu niveluri scăzute de heterozigoție care au trecut printr -un blocaj au fost mai puțin tolerante la concentrații mari de sare (Figura 26.11).

Alte *experimente* care compară populațiile *de Drosophila* Populațiile consangvinizate și neconsangvinizate expuse la medii stresante , cum ar fi temperaturile ridicate și prezența etanolului , au arătat că până și populațiile cu niveluri scăzute de consangvinizare sunt mai predispuse la dispariție la niveluri scăzute de stres ecologic decât populațiile neconsangvinizate . Rezultate

experimentale, cum ar fi

Populații neendogame;

t
:
• YO

Yo Yo Yo 1

Populații cu o singură pereche

: t
SISIS

IIIL

Trei generații: împerecheri cu o singură pereche

Populații cu consanguinitate ridicată;

Yo
t

3.0 4.05.06.0
NaCI%

FIGURA 26.11 Efectul blocajelor asupra potențialului evolutiv al diferitelor *populații de Drosophila,* ilustrat prin distribuțiile concentrației de NaCl în momentul dispariției.

Acestea indică faptul că eroziunea genetică reduce de fapt viabilitatea pe termen lung a unei populații , diminuând capacitatea acesteia de a se adapta la condițiile de mediu în schimbare .

26,5

Conservarea diversității genetice este esențială pentru supraviețuirea speciilor

Oamenii de știință care lucrează pentru menținerea diversității biologice se confruntă cu mai multe dileme. Ar trebui să se concentreze pe conservarea unor populații specifice sau ar trebui să adopte o strategie mai amplă, încercând să conserve nu doar o singură specie, ci toate plantele și animalele interdependente dintr -un ecosistem? Cum poate fi menținută diversitatea genetică la o specie în declin? Poate fi restaurată diversitatea genetică pierdută de o populație? Eforturile timpurii de conservare s -au concentrat adesea exclusiv pe dimensiunea populației unei specii amenințate. Biologii recunosc acum că eforturile de conservare trebuie să ia în considerare interacțiunea complexă a diferiților factori , cum ar fi habitatul și rolul pe care o specie îl joacă într-un ecosistem, precum și importanța variației genetice pentru supraviețuirea pe termen lung .

Conservare *ex situ :* creștere în captivitate

Conservare ex *situ* (din latină , nelalocul lui) implică scoaterea plantelor sau animalelor din habitatul lor original pentru a le menține artificial într -o grădină zoologică sau botanică . Aceste colecții pot apoi forma baza unui program de reproducere în captivitate .

Aceste programe, în care câțiva indivizi dintr -o specie amenințată sunt eliminați din sălbăticie , iar urmașii lor sunt crescuți într -un mediu protejat pentru a reconstrui populația , au jucat un rol esențial în recuperarea unui număr de specii aflate în pragul -dispariției . Cu toate acestea , astfel de programe pot avea consecințe genetice nedorite, putând pune în pericol supraviețuirea pe termen lung a speciei , chiar și după ce dimensiunea populației a fost restabilită. Un program de capturare și reproducere este rareori inițiat până când foarte puțini indivizi rămân în sălbăticie , când diversitatea genetică originală a speciei a fost deja redusă. Programul de reproducere se bazează de obicei pe un număr mic de indivizi capturați , astfel încât diversitatea este redusă și mai mult de efectul fondator . Deoarece unitățile de reproducere în captivitate permit adesea doar un grup de împerechere format dintr-un număr mic de indivizi, consangvinitatea este dificil de evitat , în special la speciile de animale care formează haremuri (grupuri de femele dominate de un singur mascul), astfel încât N este *considerabil* $_{mai\ mic}$ decât N. *În cele din urmă* , selecția neintenționată a genotipurilor cel mai bine adaptate condițiilor de reproducere în captivitate poate reduce în timp capacitatea generală a populației recuperate de a se adapta pentru a supraviețui în sălbăticie .

Cum pot fi gestionate aceste tipuri de programe pentru a minimiza aceste efecte genetice? După cum am văzut deja, pierderea diversității genetice măsurată ca heterozigoție în generațiile *t* poate fi exprimată ca

Această ecuație indică faptul că pierderea diversității genetice H_1/H_2O $_{va}$ fi mai mare cu o dimensiune efectivă a populației N_2 mai mică . și un număr mare de generații *t.* Putem extinde această ecuație pentru o populație crescută în captivitate după cum urmează:

H,/H2o = [1 - (1/2N,,>)] (1 - 1/[2N(N/N)ir' unde *Nf2o* este dimensiunea efectivă a populației fondatoare ra, *N* este mărimea medie a populației și *N* $_e$ este dimensiunea medie efectivă a *populației* grupului pe t generații . Examinând această ecuație, se poate observa că diversitatea genetică maximă a unui grup crescut în captivitate va

fi menținută (1) prin utilizarea celui mai mare număr posibil de - indivizi fondatori pentru a maximiza Nj_0 . (2) prin maximizarea N, IN_0 astfel încât cât mai mulți indivizi posibil să producă urmași în fiecare generație și (3) minimizarea numărului de generații în captivitate, pentru a reduce t. Importanța maximizării Nj_0 pentru a crește diversitatea alelică în populația fondatoare poate fi observată și în Figura 26.12. Programele de succes de acest tip pentru speciile amenințate trebuie gestionate având în vedere aceste trei obiective. În plus, menținerea unor înregistrări genealogice bune pentru a evita consangvinizarea și schimbul de indivizi între diferite programe de reproducere, atunci când este posibil, va reduce consangvinizarea.

ACUM REZOLVĂ ASTA

26.3 Douăzeci de panda roșii pe cale de dispariție care trăiesc în captivitate sunt aleși pentru a forma un grup de reproducere.

(a) Care este probabilitatea ca cel puțin unul dintre urșii panda capturați să aibă genotipul B_1/B_2, dacă $p(B_1) = 0,99$?

(b) Managementul atent menține raportul NJN al populației de panda roșii la 0,42. Dacă dimensiunea totală a populației captive este menținută la 50 de indivizi, ce proporție din heterozigoția prezentă în populația fondatoare va fi încă prezentă după 5 generații în captivitate?

- **SUGESTIE:** *Această problemă ne cere să estimăm potențialul de eroziune genetică într-o populație captivă de panda roșii pe cale de dispariție . Cheia rezolvării acesteia este de a considera că, dacă N _t /N este menținut la 0,42 și dimensiunea reală a populației este 50, se poate calcula N _r . Apoi, se utilizează ecuația furnizată mai sus.*

Creșterea în captivitate: dihorul cu picioare negre

Dihorul cu picioare negre, *Mustela nigripes* (Figura 26.13) este un exemplu excelent de specie care a fost crescută cu succes în captivitate. Acest dihor se răspândea odată în câmpiile din vestul Statelor Unite, dar până în 1970 era considerat dispărut. Deceniile de capcane și otrăvire, care au vizat atât dihorul , cât și prada sa principală, câinele de prerie, i-au decimat populațiile . Cu toate acestea, în 1981, o mică colonie a fost descoperită la o fermă din apropierea orașului Meeteetse, Wyoming. Biologii specializați în conservare au încercat inițial să conserve această populație de dihori in *situ,* dar în 1985 colonia a fost infectată cu jigodie canină, care aproape a dispărut-o. Dintre cei 18 dihori care au fost salvați și transferați într-o unitate de creștere în captivitate , doar 8 au fost considerați suficient de neînrudiți pentru a fi folosiți ca membri fondatori. Programul de creștere a dus la peste 6.500 de dihori, iar specia este acum reintrodusă în zonele habitatului său original. Scopul a fost de a stabili populații de 1.500 de dihori în colonii sălbatice sustenabile până în 2010. Până la sfârșitul anului 2008, peste 2.300 de dihori crescuți în captivitate fuseseră eliberați în 18 locații diferite , iar populațiile reintroduse din Arizona, Dakota de Sud și Wyoming se reproduc acum activ și sunt considerate - autosustenabile .

Deși recuperarea dihorului cu picioare negre pare să fi avut succes, micul grup fondator de opt indivizi a dus la un blocaj semnificativ la această specie . O pierdere suplimentară a diversității genetice a avut loc în timpul programului de reproducere în captivitate din cauza derivei , a numărului limitat de puiet al mai multor femele fondatoare și a ratei de reproducere ridicate a unuia dintre masculi.

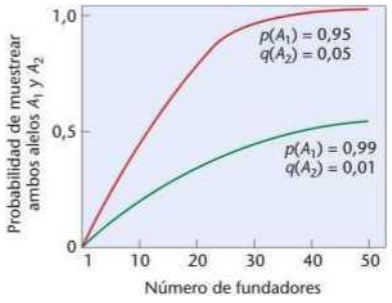


FIGURA 26.12 Efecto que tiene el número de fundadores de poblaciones criadas en cautividad sobre la probabilidad de mantener ambos alelos A_1 y A_2 de un locus.

FIGURA 26.13 El hurón de pies negros *(Mustela nigripes).*

fondatori. În concluzie, dihorii se confruntă în continuare cu riscurile implicate de consangvinizare și eroziunea genetică ulterioară, caracteristică acestor tipuri de programe.

Strategiile de gestionare genetică , cum ar fi utilizarea markerilor ADN pentru a identifica indivizii cu o variabilitate genetică mai mare , menținerea unor înregistrări genealogice atente pentru a preveni împerecherea între animale strâns înrudite și dezvoltarea de tehnici de inseminare artificială și crioconservare a spermei, au contribuit la conservarea diversității genetice rămase la această specie. Geneticienii conservării care lucrează la proiectul de recuperare estimează că toți dihorii cu picioare negre existenți au în comun aproximativ 12% din genomul lor. Acest lucru este aproximativ echivalent cu a fi veri primari. Efectele acestui grad de similaritate genetică asupra populației de dihori în expansiune sunt neclare . Ocazional, anomalii precum picioare palmate și cozi răsucite sau scurte au fost observate în populația captivă, dar, fără nicio populație nereproducută cu care să se compare , nu este clar dacă aceasta este o dovadă că consangvinitatea crește homozigoția alelelor dăunătoare.

Oamenii de știință nu sunt de acord cu privire la faptul dacă viitorul pe termen lung al dihorului cu picioare negre este compromis de blocajul sever și de pierderea ulterioară a diversității genetice pe care a experimentat-o specia. Unii geneticieni sugerează că, deoarece populația Meeteetse a fost atât de izolată, este posibil să fi avut suficientă consangvinizare pentru a elimina orice alele dăunătoare. Alți cercetători subliniază că studiile ADN ale dihorilor cu picioare negre din specimenele de muzeu arată că dihorii care trăiesc astăzi au pierdut o diversitate genetică semnificativă în comparație cu populațiile de dinainte de blocaj și sugerează că pierderea capacității de adaptare din cauza consangvinizării va deveni inevitabil evidentă în timp. Această idee este susținută de un studiu din 2008 care a utilizat analiza microsateliților pentru a evalua nivelurile de diversitate genetică în populațiile de dihori reintroduse ; studiul a constatat că animalele din populații mai mici, cu o diversitate mai mică, tind să aibă membre mai scurte și o dimensiune corporală redusă. Autorii studiului au recomandat introduceri anuale repetate de dihori suplimentari în coloniile nou reintroduse pentru a le crește rapid numărul și a minimiza efectele consangvinizării .

Conservarea *ex situ* și băncile de gene

O altă formă de conservare *ex situ* este înființarea de bănci de gene. Spre deosebire de adăpostirea animalelor sau plantelor, aceste colecții oferă depozitarea și conservarea pe termen lung a componentelor reproductive , cum ar fi sperma, ovulele și embrionii congelați în cazul animalelor și semințele, polenul și culturile de țesuturi în cazul plantelor. O bancă de gene poate conserva mult mai multe genotipuri individuale pentru perioade lungi de timp decât o colecție vie. Gameții sau semințele crioconservate pot fi utilizate pentru a reconstitui animale sau plante pierdute sau pe cale de dispariție după mulți ani de depozitare. Deoarece sunt costisitoare de construit și întreținut, majoritatea băncilor de gene sunt utilizate pentru a conserva patrimoniul genetic al speciilor domestice care au valoare economică.

În multe țări au fost înființate bănci de gene pentru a ajuta la conservarea materialului genetic de importanță agricolă, cum ar fi soiurile tradiționale de plante care nu mai sunt cultivate sau rasele antice de animale care devin rare . Una dintre cele mai importante colecții *ex situ* din Statele Unite este Centrul Național pentru Conservarea Resurselor Genetice, un serviciu al Departamentului Agriculturii (USDA) din Fort Collins, Colorado, care deține peste 300.000 de înregistrări ale soiurilor de plante cultivate și speciilor sălbatice înrudite. Unele dintre înregistrări sunt stocate sub formă de semințe, iar altele sub formă de țesuturi criogenice din care pot fi regenerate plante întregi (a se vedea fotografia de la începutul acestui capitol). Resursele genetice animale, cum ar fi sperma și embrionii congelați ai speciilor pe cale de dispariție, sunt, de asemenea, conservate la acest serviciu.

Conservarea *ex situ* folosind bănci de gene, deși adesea vitală, are mai multe dezavantaje în comparație cu alte metode de conservare. Principala problemă a băncilor de gene este că nici măcar colecțiile mari nu pot conține toată variația genetică prezentă la o specie. Geneticienii specializați în conservare încearcă să abordeze această problemă prin identificarea unei colecții de bază pentru fiecare specie. Colecția de bază este un *subset de genotipuri individuale atent selectate pentru* a conține *cât mai mult posibil din variația genetică a speciei; conservarea colecției de bază are prioritate față de conservarea și conservarea unui număr mare de genotipuri aleatorii. Un alt dezavantaj al* conservării ex *situ* este că condițiile artificiale în care o specie este conservată într-o colecție vie sau o bancă de gene își creează adesea propriile presiuni de selecție. De exemplu, atunci când semințele unei specii rare de plante sunt depozitate în depozite frigorifice, selecția poate favoriza acele genotipuri cel mai bine adaptate pentru a rezista la temperaturi scăzute, iar genotipurile care ar avea de fapt mai mult succes în mediul natural al plantei se pot pierde. O altă problemă reprezentată de conservarea ex *situ* este că, deși cea mai mare diversitate biologică, atât la speciile domestice, cât și la cele nedomestice, se

găsește de obicei în țările în curs de dezvoltare, majoritatea colecțiilor *ex situ* sunt situate în țări dezvoltate , care au resursele necesare pentru a le înființa și întreține . Acest lucru duce la conflicte privind proprietatea și accesul la valoroasele resurse genetice potențiale deținute în astfel de colecții.

Conservarea *in situ*

Conservarea in *situ* Se încearcă conservarea mărimii populației și a diversității biologice a unei specii în timp ce aceasta rămâne în habitatul său original. Utilizarea inventarelor de specii pentru a identifica punctele fierbinți de biodiversitate este un instrument important pentru determinarea celor mai bune locații pentru înființarea de parcuri și rezervații unde plantele și animalele pot fi protejate de vânătoare sau recoltare și unde habitatul lor poate fi conservat .

Pentru speciile domestice, există un interes tot mai mare pentru conservarea lor în „ferme", unde fermierilor li se oferă resurse suplimentare și stimulente economice pentru a menține soiurile tradiționale de plante și rasele de animale . Speciile non- domestice cu potențial economic au fost, de asemenea, selectate pentru - conservarea in situ . În 1998, USDA a înființat primele sale situri de conservare *in situ* . dintr -o plantă sălbatică pentru a proteja populațiile de viță de vie de stâncă nativă (Vitis rupestris *)* în mai multe state din estul SUA. Vița de vie de stâncă este valoroasă pentru viticultori, nu pentru fructele sale, ci pentru rădăcinile sale; vițele altoite pe rizomii viței de vie de stâncă sălbatice sunt rezistente la filoxeră , un dăunător grav al podgoriilor.

conservării *in situ* pentru vița de vie de stâncă, ca și pentru alte specii, este acela că se poate menține o populație mai mare, cu o diversitate genetică mai mare. Un alt avantaj al conservării *in situ* este acela că speciile continuă să trăiască și să se reproducă în mediile la care s-au adaptat, reducând probabilitatea unor noi presiuni de selecție care ar putea produce modificări nedorite ale frecvențelor alelelor . Cu toate acestea, pe măsură ce populația umană continuă să crească, izolarea zonelor adecvate pentru conservarea *in situ* prezintă o provocare semnificativă. De exemplu, chiar și în rezervații mari, cum ar fi Parcul Național Yellowstone , migrația și fluxul genetic al speciilor precum ursul grizzly american pot fi eliminate, rezultând o pierdere a diversității genetice . Această problemă este și mai acută în zonele mai mici și fragmentate ale habitatului protejat.

Creșterea populației

Ce considerații genetice ar trebui să însoțească eforturile de restabilire a populațiilor sau speciilor în declin? După cum am văzut deja, populațiile care se confruntă cu un blocaj continuă să sufere consecințele nivelurilor scăzute de diversitate genetică, chiar și după ce dimensiunea lor și-a revenit . De asemenea, am observat că consangvinitatea și deriva contribuie la eroziunea genetică în populațiile mici, iar fragmentarea perturbă migrația și fluxul genetic , reducând și mai mult diversitatea . Programele de creștere în captivitate concepute pentru a restabili speciile aflate în pericol critic de dispariție pornind de la doar câțiva indivizi supraviețuitori prezintă riscul de eroziune genetică în populația reînnoită din cauza efectului fondator și a consangvinității , ca în cazul dihorului cu picioare negre .

O strategie alternativă, utilizată de biologii specializați în conservare , este creșterea populației - *creșterea dimensiunii unei populații în declin prin relocarea și eliberarea indivizilor din aceeași specie capturați sau colectați din populații mai mari din alte părți . Am descris* anterior încercări de a restabili fluxul genetic în populațiile foarte fragmentate ale ciocănitoarei cu cioc roșu , o specie pe cale de dispariție , prin creșterea populațiilor mai mici. Alte proiecte de creștere a populației din Statele Unite includ cele care implică oaia bighorn și ursul grizzly din Munții Stâncoși .

Această metodă a fost utilizată și în cazul pumei din Florida (Figura 26.14), utilizând o populație izolată de mai puțin de 30 de animale, limitată la o zonă din jurul Mlaștinii Big Cypress și Parcului Național Everglades din sudul Floridei. După cum vom explica în secțiunea Genetică, tehnologie și societate *de la sfârșitul* acestui capitol, studiile genetice *au relevat* niveluri ridicate de consangvinitate la puma din Florida , cu o capacitate biologică redusă din cauza anomaliilor reproductive severe și a unei susceptibilități crescute la infecții parazitare . În efortul de a combate aceste defecte, opt pume femele neînrudite au fost eliberate în Florida în 1995.

FIGURA 26.14 Puma din Florida *(Puma concolor coryi).*

Unei populații din Texas i s-a permis să se încrucișeze cu populația din Florida. Programul de augmentare este considerat acum un succes, deoarece a produs grupuri familiale genetic mai diverse, a redus defectele genetice și a îmbunătățit supraviețuirea populației. Cazul pumei din Florida arată cum augmentarea poate crește dimensiunea populației și diversitatea genetică dacă indivizii relocați nu sunt înrudiți cu cei din populația țintă. Cu toate acestea, puma din Florida demonstrează și o problemă potențială cu augmentarea populației, numită flux genetic. Aceasta apare atunci când *fondul genetic al populației originale este copleșit de diferitele genotipuri ale indivizilor relocați și își pierde identitatea.* Potențialul de creștere în continuare a populației de pume din Florida rămâne controversat , deoarece mulți biologi susțin că trăsăturile unice care permit clasificarea pumei din Florida ca o subspecie distinctă se vor pierde dacă are loc împerecherea cu alte pume.

programul de creștere a pumei din Florida, o altă dificultate cauzată de creșterea populației este depresia non - consangvină, *care reprezintă o reducere a capacității de adaptare a urmașilor proveniți din încrucișări între indivizi diverși genetic.* Se crede că depresia non-consangvină, care apare în generația F1, se datorează faptului că urmașii sunt mai puțin adaptați la condițiile locale de mediu decât părinții lor . Acest fenomen a fost documentat la unele specii de plante unde semințe din aceeași specie, dar dintr-o locație diferită, au fost folosite pentru a repopula o zonă afectată prin polenizare încrucișată cu plantele locale rămase. Se crede că depresia non-consangvină care apare în generația F2 și ulterior se datorează perturbării complexelor genetice coadaptate - *grupuri de alele care au evoluat pentru a acționa împreună și a oferi cel mai înalt nivel de capacitate de adaptare unui individ.* Acest tip de depresie non-consangvină a fost documentat la urmașii hibrizi proveniți din încrucișări între pești din diferite populații de somon din Alaska. Aceste studii sugerează că restabilirea celui mai benefic tip și cantitate de diversitate genetică într-o populație este mai complexă decât se credea anterior, întărind argumentul că cea mai bună strategie pe termen lung pentru supraviețuirea speciilor este de a preveni pierderea diversității în primul rând.

GENETICĂ, TEHNOLOGIE ȘI SOCIETATE

Bazine genetice și specii amenințate: situația gravă a pumei din Florida

Povestea pumei din Florida oferă un exemplu remarcabil - al unui animal adus în pragul dispariției și provocările care trebuie depășite pentru a -l readuce într-un loc sănătos în cadrul ecosistemului . Puma din Florida este o populație de pume nord-americane (cunoscute și sub numele de pume sau pantere) aflată în pericol de dispariție. Aceste pume au locuit odată în tot sud-estul Americii de Nord, din Carolina de Sud și Arkansas până la vârful sudic al Floridei; cu toate acestea, acum ocupă mai puțin de 5 % din arealul lor original în sudul Floridei . După primele așezări umane , pumele au fost ucise prin vânătoare, otrăvire, animale ucise pe șosea și distrugerea - habitatului prăzii lor (în principal căprioare și mistreți). Până în 1967, puma din Florida a fost inclusă pe lista speciilor pe cale de dispariție și au mai rămas doar aproximativ 30. Estimările populației au prezis că puma din Florida va dispărea în jurul anului 2055.

Din cauza izolării geografice și a consangvinității, pumele din Florida au avut cele mai scăzute niveluri de heterozigozie genetică dintre toate subspeciile de pume . Această pierdere a diversității genetice s-a manifestat prin apariția unor defecte genetice grave . De exemplu, aproape 80 % dintre masculii născuți după 1989 în regiunea Big Cypress au prezentat o tulburare autosomal dominantă sau recesivă legată de X, cunoscută sub numele de *criptorhidism* - incapacitatea unuia dintre cele două testicule de a coborî . Acest defect este asociat cu niveluri scăzute de testosteron și un număr redus de spermatozoizi . De asemenea, în populația de pume din Florida au apărut defecte cardiace congenitale severe, posibil din cauza unei gene autosomal dominante defecte. În plus, au apărut unele imunodeficiențe, făcând mica populație de pume mai susceptibilă la boli și contribuind în continuare la declinul populației. Au apărut și alte trăsături genetice mai puțin severe, cum ar fi cozile ondulate sau spiralele de blană pe spate.

În ultimele două decenii, agențiile federale și statale, precum și persoanele fizice , au implementat un program de recuperare pentru puma din Florida. Scopul programului este de a crește populația la peste 500 de animale și de a le oferi o șansă de supraviețuire de 95%, menținând în același timp diversitatea lor genetică peste 90%. Planul include o protecție strictă, extinderea și îmbunătățirea habitatului pumelor și educația proprietarilor de terenuri . Au fost construite pasaje subterane pe autostrăzile din teritoriul pumelor , iar acestea au redus semnificativ decesele pumelor de pe autostrăzi (care anterior reprezentau aproape jumătate din totalul deceselor pumelor) .

Pentru a încetini efectele nocive ale consangvinizării , opt femele sălbatice de puma texană au fost eliberate pe teritoriul pumelor din Florida în 1995. Două dintre femele au supraviețuit și au născut pui sănătoși. De atunci, populația de puma - crescut la aproximativ 130 de indivizi , iar urmașii pumelor texane prezintă rate de supraviețuire de peste două ori mai mari decât puii de puma din Florida de rasă pură . Defectele genetice, cum ar fi bolile de inimă , au fost reduse la jumătate , iar pumele hibride sunt vizibil mai mari și mai puternice decât rudele lor de rasă pură. Deși programul de creștere a populației este considerat un succes, unii biologi sunt îngrijorați de faptul că pumele texane ar putea copleși genetic populația distinctă de pume din Florida .

Paradoxal, succesul programului de reintroducere a reprezentat o problemă . Acum , că populația a ajuns la aproximativ 130 de exemplare, puma din Florida aproape că și -a depășit habitatul actual. Biologii estimează că populația trebuie să ajungă la cel puțin 250 de indivizi pentru a se autosusține . Pentru a atinge acest număr, pumele vor trebui să își extindă teritoriul , intrând din nou în concurență directă cu expansiunea umană în Florida. Biologii evaluează acum noi teritorii potențiale pentru populația în creștere de pume din Florida - inclusiv părți din Louisiana , Arkansas și Carolina de Sud .

În ciuda succesului programului de reintroducere , supraviețuirea pumei din Florida este departe de a fi garantată. Întoarcerea pumelor va necesita ani de monitorizare și intervenții frecvente. În plus, oamenii trebuie să fie dispuși să își împartă pământul cu creaturi sălbatice care sunt periculoase și nu aduc beneficii directe oamenilor. Cu toate acestea, sprijinul public pentru revenirea pumei din Florida a fost puternic , așa că ar putea exista speranță pentru acest animal distinctiv și impresionant .

Rândul tău

I. Acordați-vă timp, individual sau în grup, pentru a răspunde la următoarele întrebări. Cercetați referințele și linkurile furnizate pentru a vă ajuta să înțelegeți unele dintre provocările legate de Programul de recuperare a pumei din Florida.

1. Studii genetice recente sugerează că puma din Florida ar putea fi prea strâns înrudită cu alte pume nord-americane pentru a justifica clasificarea subspeciei . Cum au fost realizate aceste studii genetice și cum ați interpreta rezultatele lor în raport cu puma din Florida ?

Pentru a afla mai multe despre relația genetică dintre pumele americane, consultați Culver, M. și colab. 2000. Genetic Ancestry *of the* American Puma (*Puma concolor). J. Heredity* 91 (3): 186-197.

2. Cum credeți că datele din studiul realizat de Culver și colaboratorii săi ar putea susține și complica eforturile de reintroducere a pumei din Florida, specie pe cale de dispariție ?

O expoziție despre avantajele relative ale metodelor de sortare genetică și tradițională poate fi găsită la Florida Panther Recovery Plan, pe 3rd Avenue. Ediția din 2008, Serviciul pentru Pești și Faună Sălbatică din SUA, pp. 7-12. *Această lucrare poate fi accesată prin intermediul Florida Panther Net.* (http://www.pan-ther.state.fi.us).

3. Credeți că genetica sau habitatul este cel mai important factor în Programul de recuperare a pumei din Florida?

Puteți găsi o discuție interesantă despre această problemă în articolul din New York Times, „A Rare Predator Bounces Back (Now Get It Out Of Here)" (Un prădător rar își revine (acum scoateți-l de aici)) , la adresa http://www.nytimes.com/2006/03/14/science/14pant.html?scp-1sq-florida+panther&st=nyt .

P. STUDIU DE CAZ Cealaltă față a Revoluției Verzi

Pentru a crește producția de alimente , Revoluția Verde *(vezi* Capitolul 23) a încurajat dezvoltarea de tulpini consangvinizate de culturi extrem de productive. Această metodă a avut mare succes și se estimează că peste 1 miliard de oameni din întreaga lume își obțin acum întreaga hrană sau o parte din ea din aceste noi culturi . Cu toate acestea, acest program are un dezavantaj. În multe țări, pe măsură ce fermierii au adoptat aceste tulpini de culturi extrem de productive, au abandonat soiurile tradiționale ale acelor plante, care conțineau un grad ridicat de diversitate genetică. De exemplu, acum 50 de ani , fermierii din India au plantat peste 30.000 de soiuri de orez. Acum, se estimează că între 50 și 75% din toate orezăriile sunt plantate cu doar 10 soiuri . În Statele Unite , 90 % din toate soiurile de plante cultivate acum un secol au dispărut din cataloagele de semințe și nu sunt conservate în băncile de semințe . Această pierdere dramatică

a variației genetice a generat unele controverse *și* ridică mai multe întrebări.

1. Este posibil ca Revoluția Verde să reprezinte beneficii pe termen scurt, dar pierderi pe termen lung?
2. De ce este important să se păstreze diversitatea genetică a plantelor de cultură ?
3. Vor afecta schimbările climatice negativ soiurile de culturi noi *și* vechi *și,* probabil, vor reduce aprovizionarea cu alimente ?

Puncte de rezumat

1. Biodiversitatea se pierde pe măsură ce numărul speciilor de animale și plante pe cale de dispariție crește. Genetica conservării aplică principiile geneticii populațiilor pentru a conserva și restaura speciile amenințate . Una dintre principalele preocupări ale geneticii conservării este menținerea diversității genetice .
2. Diversitatea genetică include diversitatea interspecifică, care se reflectă prin numărul de specii diferite prezente într-un ecosistem, și diversitatea intraspecifică, care reflectă variația genetică în cadrul unei populații sau între diferite populații ale aceleiași specii. Diversitatea genetică poate fi măsurată prin examinarea diferitelor fenotipuri în cadrul unei populații sau, la nivel molecular, utilizând analiza aloenzimelor sau tehnici de profilare a ADN-ului.
3. Scăderile semnificative ale numărului de indivizi dintr- o populație a unei specii reduc diversitatea genetică și contribuie la riscul de dispariție, ca o consecință a derivei genetice , a consangvinizării și a pierderii fluxului genetic. Populațiile care se confruntă cu reduceri severe ale dimensiunii efective și apoi se refac au trecut printr -un blocaj .

Pentru activități, animații și întrebări de recapitulare, vă rugăm să vizitați zona de studiu la www.masteringgenetics.com

populație și prezintă adesea o diversitate genetică redusă .

4. Pierderea diversității genetice reduce capacitatea unei populații de a se adapta la condițiile de mediu în schimbare, deoarece alelele utile ar fi putut dispărut din fondul genetic. Diversitatea genetică redusă duce, de asemenea, la un nivel mai ridicat de homozigoție în populație, ceea ce duce adesea la acumularea de alele dăunătoare și la depresia consangvinității .
5. Conservarea diversității genetice depinde de *metode ex situ,* cum ar fi colecțiile vii, programele de reproducere în captivitate și băncile de gene , precum și de abordări *in situ* , cum ar fi înființarea de parcuri și rezervații.
6. Augmentarea populației, prin care indivizii sunt introduși într-o populație în declin dintr-o populație mai mare a aceleiași specii situată în altă parte, poate fi utilizată pentru a crește numărul și diversitatea genetică . Cu toate acestea, acest proces este însoțit de riscurile depresiei non-consangvinității și ale fluxului genetic.

IDEI ȘI SOLUȚII

1. o specie rară, fragmentată în mai multe subpopulații , mai vulnerabilă la dispariție decât o specie la fel de rară care formează o singură populație mare? Ce factori ar trebui luați în considerare atunci când se gestionează populațiile fragmentate ale unei specii rare?

Soluție. O specie rară, în care indivizii rămași sunt împărțiți în subpopulații mici, izolate, poate părea mai puțin vulnerabilă. Dacă o subpopulație dispare din cauze locale, cum ar fi bolile sau pierderea habitatului, subpopulațiile rămase pot supraviețui în continuare. Cu toate acestea , deriva genetică va face ca populațiile mai mici să experimenteze o creștere mai rapidă a homozigoției în timp , comparativ cu populațiile mai mari. Chiar și în cazul împerecherii aleatorii, schimbarea heterozigoției de la o generație la alta din cauza derivei poate fi calculată ca

$$H) = H_2O \text{ (l - 1/2N)}$$

Unde H1 este frecvența heterozigoților în generația curentă, H1 este frecvența heterozigoților în generația următoare , iar *N* este numărul de indivizi din populație. Astfel, într-o populație mică de 50 de indivizi, cu o frecvență inițială a heterozigoților de 0,5, heterozigoția va scădea la 0,5(1 - 1/100) = 0,495, o pierdere de 0,5 % într- o singură generație. Într-o populație mai mare de 500 de indivizi și cu aceeași frecvență inițială a heterozigoților , după o generație, heterozigoția va fi de 0,5(1 - 1/1000) = 0,4995, o pierdere de doar 0,05%.

Prin urmare , populațiile mai mici sunt susceptibile de a prezenta efectele homozigozității pentru alelele dăunătoare mai devreme decât populațiile mai mari, chiar și în cazul împerecherii aleatorii. Dacă populațiile sunt fragmentate , împiedicând mișcarea indivizilor sau a gameților între ele, opțiunile de gestionare ar putea include relocarea indivizilor dintr -o subpopulație în alta pentru a facilita fluxul genetic . De asemenea , ar putea fi luată în considerare stabilirea de coridoare pentru fauna sălbatică formate din habitate - neperturbate care leagă populațiile fragmentate . În populațiile captive , se poate implementa schimbul de adulți reproducători (sau de gameți ai acestora , prin trimiterea de spermă sau polen conservat) . Cu toate acestea , eforturile de creștere a dimensiunii populației sunt vitale pentru a preveni eroziunea genetică ulterioară cauzată de deriva genetică .

DE CUM ȘTIM >

Problemas y preguntas para la discusión

1. În acest capitol, ne -am concentrat pe genetica conservării , subliniind modul în care geneticienii prețuiesc diversitatea genetică și lucrează pentru a menține supraviețuirea speciilor . Pe parcursul acestui proces, am găsit numeroase oportunități de a analiza metodele și raționamentele care ne-au permis să dobândim o mare parte din aceste informații. Pe baza explicațiilor oferite în capitol, cum ați răspunde la următoarele întrebări fundamentale?
   (a) Cum determinăm gradul de diversitate genetică al unei specii?
   (b) De unde știm că există o scădere a diversității genetice și că acest lucru este în detrimentul supraviețuirii speciilor?
   (c) De unde știm că are loc o derivă genetică și că aceasta este dăunătoare supraviețuirii speciilor ?
   (d) De unde știm că creșterea populației îmbunătățește șansele de supraviețuire ale unei specii ?
   (e) Cum încercăm să „conservăm* diversitatea genetică existentă ?”

2. Condrodistrofia, o formă letală de nanism, a fost detectată recent la o populație captivă de condori din California , unde a ucis embrionii a 5 din 169 de ouă fertile. Condrodistrofia la condor pare a fi cauzată de o alelă autosomal recesivă , cu o frecvență estimată de 0,09 în fondul genetic al acestei specii.
   (a) Cum credeți că ar trebui gestionate populațiile de condori din California în viitor pentru a minimiza efectul acestei alele letale?
   (b) Care sunt avantajele și dezavantajele încercării de a -l elimina din fondul genetic?
3. Un genetician studiază trei loci, fiecare cu o alelă dominantă și una recesivă, într-o populație mică a unei plante rare . El estimează că frecvențele alelelor la fiecare dintre aceste loci sunt $A = 0,75$, $a = 0,25$; $B = 0,80$, $b = 0,20$; $C = 0,95$, $c = 0,05$. Care este probabilitatea ca toate alelele recesive să se piardă din cauza derivei genetice?

Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com

4. Cât de similare sunt deriva populației și consangvinitatea în ceea ce privește efectele lor asupra populației? Cât de diferite sunt ele?

MG

5. Imaginează- ți că ești administratorul unei rezervații naturale africane cu o turmă nativă de 16 rinoceri negri, o specie amenințată la nivel global . Descrie cum ți-ai gestiona turma pentru a stabili o populație viabilă în parc. Ce factori genetici ar trebui luați în considerare în planul tău de management ?
6. Comparați cauzele și efectele depresiei consangvinizate și ale depresiei non- consangvinizate .
7. Clonarea, folosind tehnici similare cu cele folosite de oamenii de știință scoțieni pentru a crea oaia Dolly, a fost propusă ca o modalitate de a crește numărul unor specii de mamifere pe cale de dispariție . Enumerați avantajele și dezavantajele utilizării unei astfel de tehnici pentru a ajuta la supraviețuirea pe termen lung a acestor specii .
8. Într -o populație de mac sălbatic dintr -o regiune muntoasă îndepărtată din estul Mexicului, aproape toți membrii au flori galben pal , dar experimentele de încrucișare arată că galbenul pal este recesiv spre portocaliu aprins . Folosind instrumentele genetice de conservare descrise în acest capitol, cum ați putea determina experimental dacă prevalența fenotipului recesiv în populația de mac din estul Mexicului se datorează selecției naturale sau pur și simplu efectelor derivei genetice și / sau consangvinității ?
9. Comparați tehnicile de conservare *in situ* cu tehnici de conservare ex *situ* .
10. se aplică conservarea *ex situ* prin creșterea în captivitate a mai multor specii aflate în pericol critic de dispariție.
11. Explicați de ce diversitatea genetică scăzută a unei specii este dăunătoare supraviețuirii acesteia .
12. Comparați analiza aloenzimelor cu analiza RFLP ca măsură a diversității genetice .
13. Folosește analiza ta despre *panda* roșu din secțiunea Acum *rezolvă asta* (26.3) să sugereze modalități de gestionare a creșterii în captivitate a pandelor roșii pentru a menține cât mai multă diversitate genetică - posibil.

Problemas extrapicantes

14. *Antechinus agilis,* un marsupial mic, asemănător unui șoarece, găsit în Australia , se împerechează pe o perioadă de 10 până la 15 zile în august, timp în care femelele ovulează, iar masculii mor din cauza stresului. Femelele folosesc spermă stocată de la mai mulți masculi pentru a-și fertiliza ovulele . Folosind tehnici de profilare ADN , cercetătorii au stabilit că femelele sunt capabile să elibereze un amestec de spermă pentru fertilizare - indiferent de momentul în care masculii și femelele sunt parcate sau de momentul în care femelele ovulează - menținând astfel o heterogenitate genetică ridicată în absența masculilor (Shimmin et al . , 2000) . Credeți că strategia de reproducere a *Antechinus* oferă informații despre măsurile utilizate de organismele pentru a menține variația genetică ?
15. După cum relevă analiza microsateliților, pierderea și fragmentarea habitatului au dus la o pierdere semnificativă a heterozigoției în rândul a nouă populații de urs negru din Florida *(Ursus americana floridanus).* Cercetătorii au stabilit că , deși fiecare populație se afla în echilibru Hardy-Weinberg , heterozigoția medie a fost mai mică în populațiile mai mici , mai puțin interconectate, iar fiecare populație a fost distinctă genetic (Dixon et al., 2007). Nu s-a găsit nicio relație între gradul de diferență genetică și distanța față de populațiile învecinate .

MG *Pentru a vizualiza problemele și tutorialele atribuite de profesor, vă rugăm să vizitați www.masteringgenetics.com*

(a) Credeți că era de așteptat constatarea că heterozigoția medie este mai mică în populațiile mai mici și mai puțin interconectate ?
(b) Având în vedere că ursul negru din Florida locuiește în zone relativ populate, ce ar explica lipsa de relație

dintre diferențele genetice și distanțele dintre diferitele populații?

(c) Având în vedere că heterozigoția scăzută contribuie adesea la o probabilitate redusă de supraviețuire a speciei , ce măsuri ar putea fi luate pentru a îmbunătăți perspectivele de supraviețuire ale ursului negru din Florida?

Fiind în pragul dispariției, dihorii cu picioare negre , care sunt prădători ai câinilor de prerie , au crescut ca număr de la 18 indivizi în 1985 la aproximativ 700, ocupând în prezent o zonă de reintroducere în Parcul Național Buffalo Gap Grassland (O'Neill, 2007). Cu toate acestea, deoarece câinii de prerie mănâncă iarba pe care pasc vitele, unii crescători de animale doresc să reducă populația de câini de prerie din acea zonă, unde pasc aproximativ 30.000 de capete de vite . Serviciul Forestier al SUA elaborează un plan care echilibrează interesele crescătorilor de animale, ale câinilor de prerie și ale dihorilor cu picioare negre .

(a) avea o reducere a populațiilor de câini de prerie asupra populațiilor de dihori cu picioare negre ?

(b) Conservaționiștii susțin că expunerea populației de dihori cu picioare negre la un al doilea blocaj genetic i-ar afecta ireversibil șansele de supraviețuire . Alții ar putea argumenta că, din moment ce populația de dihori cu picioare negre și-a revenit după un blocaj în trecut, ar trebui să fie capabilă să se refacă și după un alt blocaj în viitor . Sunteți de acord ?

(c) Având în vedere că dihorul cu picioare negre este unul dintre cele mai periclitate mamifere americane, ce fel de compromis ați propune care să țină cont de nevoile fermierilor , ale câinilor de preerie și ale dihorului cu picioare negre ?

Caii lui Przewalski *(Equus przewalskii),* considerați de unii biologi specia ancestrală din care au fost domesticiți caii moderni, sunt clasificați ca o specie distinctă de calul domestic, deși indivizii celor două specii se pot încrucișa și pot produce urmași fertili. Caii lui Przewalski au fost vânați până la dispariție în habitatul lor natural din stepele asiatice în jurul anului 1920. Cele câteva sute de cai lui Przewalski care trăiesc astăzi sunt descendenți ai 12 supraviețuitori care fuseseră ținuți în captivitate . Grupul fondator a inclus și o iapă domestică. În prezent, există interes pentru reintroducerea cailor lui Przewalski în habitatul lor original. Ce sfaturi le-ați da biologilor conservatori care gestionează proiectul de reintroducere?

18. ADN-ului bazată pe diferite tipuri de markeri moleculari este din ce în ce mai mult utilizată pentru a măsura nivelurile de diversitate genetică în populațiile de specii amenințate și pe cale de dispariție. Credeți că aceste estimări bazate pe markeri ale diversității genetice sunt indicatori fiabili ai potențialului unei populații de a supraviețui și de a se adapta într-un mediu natural? De ce da sau de ce nu?
19. Băncile de semințe oferă protecție specifică pentru conservarea atât a speciilor importante din punct de vedere economic, cât și a celor neeconomice . Un studiu a cuantificat o scădere considerabilă a capacității biologice a semințelor depozitate pentru perioade lungi de timp (Schoen et al., 1998). Când germinarea scade sub 65-85%, se recomandă regenerarea (semănatul și recoltarea semințelor) a unui eșantion limitat de tipuri de semințe depozitate . Ce consecințe genetice ar putea fi așteptate să însoțească practica de conservare a depozitării și regenerării semințelor pe termen lung ?
20. Potrivit unui autor, „Una dintre primele întrebări pe care un manager de resurse și le pune atunci când discută despre speciile amenințate sau pe cale de dispariție este : Cât de gravă este problema?" (Holmes, 2001). Cu alte cuvinte, managerul solicită o analiză a viabilității populației care include estimări ale riscului de dispariție . Ce factori ar fi considerați semnificativi în furnizarea unei estimări a riscului de dispariție pentru o specie?
21. Se consideră că majoritatea secvențelor de ADN microsatelit sunt selectiv neutre și extrem de heterozigote în populațiile naturale. Având în vedere că gheparzii au cunoscut un blocaj populațional acum aproximativ 12.000 de ani , pumele nord-americane acum aproximativ 10.000 de ani și leii din Parcul Național Gir acum aproximativ 1.000 de ani, la care dintre aceste specii v -ați aștepta să detectați cel mai mare grad de polimorfism microsatelit ? Și cel mai scăzut?

22 În multe eforturi de conservare, oamenii de știință nu dispun de date suficiente pentru a lua decizii definitive . Cu toate acestea , alocarea resurselor nu poate fi amânată până când astfel de date nu sunt disponibile . În aceste cazuri, eforturile de conservare sunt adesea îndreptate către trei clase de specii: specii emblematice, specii umbrelă (specii care necesită habitate mari) și indicatori de biodiversitate (specii care reprezintă habitate diverse și în special productive) (Andelman și Fagan, 2000). Pentru a proteja speciile amenințate, ce avantaje și dezavantaje ar exista la investirea de talente și resurse limitate în fiecare dintre aceste clase de specii ?

Anexa A

LECTURI SELECTATE

Capitolul 1 Introducere în genetică

Amman, NH 2008. În apărarea culturilor modificate genetic. *Science* 322: 1465-1466 .

Bilen, J. și Bonini, NM 2005. *Drosophila* ca model pentru boala neurodegenerativă umană. *Anul. Rev. Genet.* 39: 153-171.

Campbell, AM și Heyer, LJ (2007). *Descoperind genomica, proteomica și bioinformatica,* a 2-a ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings.

Orez modificat genetic rezistent la insecte în China: de la cercetare la comercializare. *Ann. Rev. Entomol.* 56: 81-101.

Dale, PJ, Clarke, B. și Fontes, EMG 2002. Potențialul impactului asupra mediului al culturilor transgenice. *Nature Biotech.* 20: 567-574.

Daya, S. și Berns, KI 2008. Terapie genică utilizând vectori virali adenoasociați. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 83-93.

Ehrnhoefer, DE, Butland, SL, Pouladi, MA și Hayden, MR 2009. Modele murine ale bolii Huntington: Variațiuni pe o temă. *Dis. Models Meeh.* 2: 123-129.

Lonberg, N. 2005. Anticorpi umani de la animale transgenice. *Nature Biotech.* 23: 1117-1125.

Müller, B. și Grossnicklaus, U. 2010. Organisme model - O perspectivă istorică. /. *Proteomics* 73: 2054-2063.

Pearson, H. 2006. Ce este o genă? Nature 441: 399-401.

Pray, CE, Huang, J., Hu, R. și Rozelle, S. 2002. Cinci ani de bumbac Bt în China - Beneficiile continuă. *The Plant Journal* 31: 423-430.

Primrose, SB și Twyman, RM 2004. *Genomică: Aplicații în biologia umană.* Oxford: Blackwell Publishing.

Wisniewski, JP., Frange, N., Massonneau, A. și Dumas, C. 2002. Între mit și realitate: Porumbul modificat genetic, un exemplu de controversă științifică de amploare. *Biochimie* 84: 1095-1103.

Capitolul 2 Mitoză și meioză

Alberts, B., *și colab.* 2007. *Biologia moleculară a celulei,* 5. ª ed. Nueva York: Garland Pubi.

Brachet, I. și Mirsky, A. E. 1961. *Celula: Meioză și mitoză,* vol. 3. Orlando, FL: Academic Press.

DuPraw, EJ 1970. *ADN și cromozomi.* Nueva York: Holt, Ri nehart și Winston.

Glotzer, M. 2005. Cerințele moleculare pentru citokineză. *Science 307:* 1735-1739.

Glover, DM, Gonzalez, C. și Raff, *JW 1993.* Centrosomul. *Sci. Am.* (iunie) 268: 62-68.

Golomb, HM și Bahr, G. F. 1971. Observații prin microscopie electronică cu scanare ale structurilor de suprafață ale cromozomilor umani izolați . *Science* 171: 1024-1026.

Hartwell, LH și Karstan, MB 1994. Controlul ciclului celular și cancerul . *Science* 266:1821-1828.

Hartwell, L. H. și Weinert, T. A. 1989. Puncte de control care asigură ordinea evenimentelor ciclului celular. *Știință* 246: 629-634.

Ishiguro, K. și Watanabe Y. 2007. Coeziunea cromozomiilor în mitoză și meioză. /. *Cell Sci.* 120: 367-369.

Mazia, D. 1961. Cum se divid celulele. *Știință. Am.* (ianuarie) 205: 101-120.

Mazia, D. 1974. Ciclul celular . *Sci. Am.* (ianuarie) 235: 54-64.

McIntosh, J. R. și McDonald, KL 1989. Fusul mitotic. *Sci. Am.* (octombrie) 261: 48-56. *Nature Milestones. 2001. Diviziunea celulară.* Londra: Nature Publishing Group.

Watanabe Y. 2005. Shugoshin: Spiritul păzitor la centromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 590-595.

Westergaard, M. și von Wettstein, D. 1972. Complexul sinaptinemal . *Annu. Pr. Genet.* 6: 71-110.

Capitolul 3 Genetica mendeliană

Bennett, RL *și colab.* 1995. Recomandări pentru nomenclatura standardizată a pedigree-ului uman . *Am. J. Hum. Genet.* 56: 745-752.

Carlson, E. A. 1987. *Gena: o istorie critică,* ediția a 2-a . Philadelphia : Saunders.

Dunn, L. C. 1965. *O scurtă istorie a geneticii.* Nueva York: iMcGraw -Hill.

Henig, R. M. 2001. Călugărul din grădină: Geniul pierdut și găsit al lui Gregor Mendel, părintele geneticii. Nueva York: Houghton-Mifflin.

Klein, J. 2000. Câmpul viselor de Johann Mendel . *Genetică* 156:1-6.

Miller, JA 1984. Mazărea lui Mendel: o chestiune de geniu sau de viclenie? *Știri științifice* 125: 108-109.

Olby, R. C. 1985. *Originile mendelismului ,* 2. ed . Londra: Constable.

Orel, V. 1996. Gregor Mendel: Primul genetician. Oxford: Oxford University Press.

Peters, J., ed. 1959. *Lucrări clasice de genetică.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Schwartz, J. 2008. În căutarea genei: De la Darwin la ADN. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Sokal, RR y Rohlf, FJ 1995. *Biometry,* 3. ª ed. Nueva York: W. H. Freeman.

Stern, C. și Sherwood, E. 1966. *Originile geneticii:* o *carte sursă Mendel.* San Francisco: W. H. Freeman.

Stubbe, H. 1972. Istoria geneticii: Din timpurile preistorice până la redescoperirea legilor lui Mendel. Cambridge, MA: MIT Press.

Sturtevant, AH 1965. O *istorie a geneticii.* Nueva York: Harper & Row.

Tschermak-Seysenegg, E. 1951. Redescoperirea operei lui Mendel . *J. Hered.* 42: 163-172.

Welling, F. 1991. Studiu istoric: Johann Gregor Mendel 1822 1884. *Am. J. Med. Genet.* 40:1-25.

Capitolul 4 Amplificări ale geneticii mendeliene

Bartolomei, MS și Tilghman, SM 1997. Amprentarea genomică la mamifere. *Ann. Rev. Genet.* 31:493-525.

Brink, R. A., ed. 1967. *Moștenire de la Mendel.* Madison: University of Wisconsin Press.

Bultman, SJ, Michaud, EJ și Woychik, R. P. 1992. Caracterizarea moleculară a locusului *agouti de* șoarece . *Cell* 71:1195-1204.

Carlson, EA 1987. *Gena: o istorie critică, ed. a 2-a* ediție. Philadelphia : Saunders.

Cattanach, BM și Jones, J. 1994. Amprenta genetică la șoarece: Implicații pentru reglarea genelor. *I. Inherit. Metab. Dis.* 17: 403-420.

Dunn, LC 1966. *O scurtă istorie a geneticii.* Nueva York: McGraw-Hill.

Fell, R. și Khosla, S. 1999. Amprentarea genomică la mamifere: o interacțiune între cromatină și metilarea ADN-ului. *Trends in Genet.* 15:431.

Foster, M. 1965. Genetica pigmenților la mamifere. *Adv. Genet.* 13: 311-339.

Grant, V. 1975. *Genetica plantelor cu flori.* Nueva York: Columbia University Press.

Harper, PS, și alții, 1992. Anticiparea în distrofia miotonică: o nouă perspectivă asupra unei probleme vechi. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 10-16.

Howeler, C. J., și colab. 1989. Anticiparea în distrofia miotonică: realitate sau ficțiune? *Creier* 112: 779-797.

Morgan, TH 1910. Moștenire limitată de sex la *Drosophila. Science 32* : 120-122.

Peters, JA, ed. 1959. *Lucrări clasice de genetică.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Phillips, PC 1998. Limbajul interacțiunii genelor. *Genetics* 149: 1167-1171.

Race, R. R. și Sanger, R. 1975. *Grupele sanguine la om, ed. a* 6- ª . Oxford: Blackwell.

Sapienza, C. 1990. Amprentarea parentală a genelor. *Sci. Am.* (octombrie) 363: 52-60.

Syracuse, LD 1994. Gena *agouti* : s-a îngălbenit. *Celula* 10: 423–428.

Waters, DJ și Wildasin, K. 2006. Indicii despre cancer la câinii de companie. *Sci. Am.* (decembrie) 295: 96-101.

Yoshida, A. 1982. Genetica biochimică a sistemului ABO al grupei sanguine umane. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 1-1

Capitolul 5 Cartografierea cromozomilor la eucariote

Allen, G. E. 1978. *Thomas Hunt Morgan: Omul și știința sa.* Princeton, NJ: Princeton University Press.

Chaganti, R., Schonberg, S. și German, J. 1974. O creștere multiplă a schimbului de cromatide surori în limfocitele sindromului Bloom . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:4508-4512.

Creighton, HS și McClintock, B. 1931. O corelație între încrucișarea citologică și genetică la *Zea mays. Proc. Natl. Acad. Sd.* 17: 492-497.

i -au oferit experimentele lui Mendel de a observa legătura? *Heredity* 38: 253-257.

Ellis, N. A., și colab., 1995. Produsul genei sindromului Bloom este omolog cu helicazele RecQ . *Celulă* 83: 655-666.

Ephrussi, B. și Weiss, M. C. 1969. Celule somatice hibride . *Sci. Am.* (aprilie) 220: 26-35.

Latt, S. A. 1981. Formarea schimbului de cromatide surori . *Annu. Rev. Genet.* 15:11-56.

Lindsley, D. L. și Greii, E. H. 1972. *Variații genetice ale Drosophila melanogaster.* Washington, DC: Institutul Carnegie din Washington.

Morgan, T. H. 191 1. O încercare de a analiza constituția cromozomilor pe baza moștenirii legate de sex la Dros *sophila* . *J. Exp. Zool.* 11: 365-414.

Morton, NE 1955. Test secvențial pentru detectarea legăturii. *Am. J. Hunt. Genet.* 7: 277-318.

Morton, N. E. 1995. Niveluri de densitate (LOD) – trecut și prezent. *Genetics* 1 40: 7-12.

Neuffer, MG, Jones, L. și Zober, M. 1968. *Mutanții porumbului.* Madison, WI: Crop Sci. Soc. of America.

Perkins, D. 1962. Încrucișare și interferență într- un braț cromozomial marcat multiplu al Neurospora . *Genetics* 47: 1253-1274.

Ruddle, F. H. și Kucherlapati, RS 1974. Celule hibride și gene umane. *Sci. Am.* (iulie) 231: 36-49.

Stahl, F. W. 1979. *Recombinare genetică.* Nueva York: WH Freeman.

Stern, C. 1936. Încrucișare somatică și segregare la *Drosophi la melanogaster. Genetics* 21:625-631.

Sturtevant, A. H. 1913. Aranjamentul liniar a șase factori legați de sex la *Drosophila,* așa cum este demonstrat de modul lor de asociere. *J. Exp. Zool.* 14: 43-59.

Sturtevant, A. H. 1965. O *istorie a geneticii.* Nueva York: Harper & Row.

Voeller, B. R., ed. 1968. Teoria cromozomială a moștenirii: Lucrări clasice despre dezvoltare și ereditate. Nueva York: Appleton -Century-Croft.

Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007. Studiu de asociere a -genomului pe 14.000 de cazuri din șapte boli comune și 3.000 de controale comune . *Nature* 447: 661-676.

Wolff, S., ed. 1982. *Schimb de cromatide surori.* New York: Wiley -Interscience.

Capitolul 6 Analiză genetică și hărți în bacterii și bacteriófagos

Adelberg, E. A. 1960. *Lucrări despre genetica bacteriană.* Boston: Little le, Brown.

Benzer, S. 1962. Structura fină a genei. *Sci. Am.* (ianuarie) 206: 70-86.

Birge, EA 1988. Genetica bacteriilor și bacteriofagelor - O introducere . Nueva York: Springer-Verlag.

Brock, T. 1990. *Apariția geneticii bacteriene.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

Bukhari, AI, Shapiro, JA și Adhya, SL, eds. 1977. Elemente *de inserție de ADN , plasmide și epizomi.* Primăvara rece

Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

Cairns, J., Stent, G. S. și Watson, JD, eds. 1966. *Fagii și originile biologiei moleculare.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

Campbell, A. M. 1976. Cum își inserează virusurile ADN-ul în ADN-ul celulei gazdă . *Sci. Am.* (decembrie) 235: 102-113.

Hayes, W. 1968. Genetica bacteriilor și a virusurilor acestora, a 2- ª ed. Nueva York: Wiley.

Hershey, A. D. și Rotman, R. 1949. Recombinare genetică între mutanții gazdă și mutanții de tip placă ai bacteriofagului în celule individuale. *Genetics* 34: 44-71.

Hotchkiss, RD și Marmur, J. 1954. Transformări duble ale markerilor ca dovadă a factorilor legați în agenții de transformare dezoxiribonucleați. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 40: 55-60.

Jacob, F. și Wollman, EL 1961. Viruși și gene. *Sci. Am.* (iunie) 204:92-106.

Kohiyama, M. și colab. 2003. Sex bacterian: Jocul voyeurilor 50 de ani mai târziu. *Science* 301: 802-803.

Kruse, H. și Sorum, H. 1994. Transferul de plasmide cu rezistență multiplă la medicamente între bacterii de origini diverse în micromedii naturale . *Appi. Environ. Microbiol.* 60: 4015-4021.

Lederberg, J. 1986. Patruzeci de ani de recombinare genetică la bacterii: o reminiscență a celei de-a patruzecea aniversări. *Nature* 324:627-628.

Luria, SE și Delbruck, M. 1943. Mutații ale bacteriilor de la sensibilitatea la virus la rezistența la virus. *Genetics* 28:491-511.

Lwoff, A. 1953. Lizogenie. *Bacteriol. Rev.* 17: 269-337.

Miller, JH 1992. *Un curs scurt de genetică bacteriană.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

Miller, RV 1998. Schimbul de gene bacteriale în natură. *Sci. Am.* (ianuarie) 278:66-71.

Morse, ML, Lederberg, EM y Lederberg, J. 1956. Transduction in *Escherichia coli* K12. *Genetica* 41: 141-156.

Novick, RP 1980. Plasmide. *Sci. Am.* (decembrie) 243: 102-127.

Smith-Keary, PF 1989. *Genetica moleculară a Escherichia coli.* New York: Guilford Press.

Stahl, FW 1987. Recombinare genetică. *Sci. Am.* (noiembrie) 256:91-101.

Stent, GS 1966. *Lucrări despre virusurile bacteriene, ed.* a 2- ª . Boston: Little le, Brown.

Wollman, EL, Jacob, E y Hayes, W. 1956. Conjugare și recombinare genetică la *Escherichia coli* KI2. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 21: 141-162.

Zinder, ND 1958. Transducția la bacterii. *Sci. Am.* (noiembrie) 199: 38-46.

Capitolul 7 Determinarea sexului și cromozoamelor sexuale

Amory; JK, și colab. 2000. Sindromul Klinefelter. *Lancet* 356: 333-335.

Arnold, AP, Itoh, Y. și Melamed, E. 2008. O perspectivă de ansamblu asupra compensării dozei cromozomilor sexuali. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 109-127.

Court-Brown, WM 1968. Masculi cu un complement de cromozomi sexuali XYY. *J. Med. Genet.* 5: 341-359.

Davidson, R., Nitowski, H. și Childs, B. 1963. Demonstrarea a două populații de celule la femei umane heterozigote pentru variantele de glucoză-6-fosfat dehidrogenază. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 50: 481-485.

Hodgkin, J. 1990. Determinarea sexului comparativ la *Drosophila* și *Caenorhabditis. Nature* 344: 721-728.

Hook, EB 1973. Implicații comportamentale ale genotipului XYY la oameni . *Science* 179: 139-150.

Hughes, J. E. și colab., 2010. Cromozomii Y la cimpanzei și la oameni sunt remarcabil de divergenți în ceea ce *privește* structura și conținutul genetic. *Natură* 463: 536-539.

, E. E. 1996. Reglarea determinării sexului la porumb. *Eseuri biologice* 18: 363-369.

Jacobs, PA și colab. 1974. Un studiu citogenetic pe 11.680 de nou- născuți. *Ann. Hum. Genet.* 37: 359-376.

Jegalian, K. și Lahn, B. T. 2001. De ce este Y-ul atât de ciudat. *Sci. Am.* (februarie) 284: 56-61.

Koopman, P., și colab. 1991. Dezvoltarea masculină a șoarecilor masculi transgenici pentru *Sry, cu cromozomi* feminenți . *Nature* 351: 117-121.

Lahn, BT y Page, D. C. 1997. Coerența funcțională a cromozomului Y uman . *Science* 278:675-680.

Lucchesi, J. 1983. Relația dintre dozajul genetic, expresia genetică și sex la *Drosophila. Dev. Genet.* 3:275-282.

Lyon, MF 1972. Inactivarea cromozomului X și modelele de dezvoltare la mamifere. *Biol. Rev.* 47:1-35.

Marshall Graves, *JA 2009.* Păsările fac asta cu o genă Z. *Nature* 461: 177-178.

McMillen, MM 1979. Mortalitatea diferențială în funcție de sex în decesele fetale și neonatale. *Science* 204:89-91.

Ng, K., Pullirsch, D., Leeb, M. și Wutz, A. 2007. Xist și ordinea reducerii la tăcere. *Rapoarte EMBO* 8: 34-39.

Nora, EP și Heard, E. 2009. Inactivarea cromozomului X: Când contează doza. *Cell* 139: 865-868.

Penny, G. D., și colab. 1996. Cerința pentru Xist în inactivarea cromozomului X. *Nature* 379: 131-137.

Pieau, C. 1996. Variația temperaturii și determinarea sexului la reptile. *BioEssays* 18: 19-26.

Quinn, A. E. și colab., 2007. Inversarea sexului în funcție de temperatură implică dozarea genelor sexuale la o reptilă. *Science* 316: 411 .

Smith, C. A., și colab. 2009. Gena aviară DMRT1, legată de gena Z, este necesară pentru determinarea sexului masculin la pui . Nature 461: 267-270.

Becker , P. B. 2007. Compensarea dozei : începutul și sfârșitul unei generalizări. *Nat. Rev. Genet.* 8: 47-57.

Warner, DA și Shine, R. 2008. Semnificația adaptivă a determinării sexului dependentă de temperatură la o reptilă. *Nature* 451:566-567.

Westergaard, M. 1958. Mecanismul determinării sexului la plantele cu flori dioice . *Adv. Genet.* 9: 217-281.

Whitelaw, E. 2006. Descifrarea lui X în sex. *Dev. Cell* 11: 759-762 .

Witkin, H. A. și colab., 1996. Criminalitatea la bărbații din categoriile XYY și XXY. *Science,* 193: 547-555.

Xu, N., Tsai, CL. și Lee, JT 2006. Împerecherea tranzitorie a cromozomilor omologi marchează debutul inactivării X. *Science* 311: 1149-1152.

Capitolul 8 Mutații cromozomiale: variația numărului și aranjamentului cromozomilor

Antonarakis, S. E. 1998. Zece ani de genomică, cromozomul 21 și sindromul Down. *Genomică* 51: 1-16.

Ashley-Koch, AE și colab. 1997. Examinarea factorilor asociați cu instabilitatea repetiției *FMRI* CGG. *Am. J. Hum. Ge net.* 63: 776-785.

Beasley, J. 0.1942. Comportamentul cromozomilor meiotici la specii, specii - hibride, haploide și poliploide induse de *Gossypium. Genetics* 27: 25-54.

Blakeslee, A. E 1934. Stramonium nou din cromozomi vechi. *J. Hered.* 25: 80-108.

Boue, A. 1985. Citogenetica pierderilor de sarcină. *Adv. Hum. Ge net.* 14: 1-58.

Carr, D. H. 1971. Bazele genetice ale avortului. *Ann. Rev. Genet.* 5: 65-80.

Conrad, D. E. și colab. 2010. Originile și impactul funcțional al variației numărului de copii în genomul uman. *Nature* 464: 704-10.

Croce, CM 1996. Gena *FHIT* la 3p 14.2 este anormală în cancerul pulmonar. *Cell* 85: 17-26.

DeArce, MA și Kearns, A. 1984. Sindromul X fragil: Pacienții și cromozomii lor. *J. Med. Genet.* 21: 84-91.

Epstein, CJ 2006. Sindromul Down: gene critice într -o regiune critică. *Nature* 441: 582-583.

Feldman, M. și Sears, ER 1981. Resursele genetice sălbatice ale grâului. *Sei. Am.* (ianuarie) 244: 102-112.

Galitski.T., et al. 1999. Reglarea ploidică a expresiei genelor. *Science 285* : 251-254.

Gersh, M. și colab. 1995. Dovezi ale unei regiuni distincte care provoacă un țipăt asemănător pisicii la pacienții cu deleții 5p. *Am. I. Hum. Genet.* 56: 1404-1410.

Hassold, TJ și colab. 1980. Efectul vârstei materne asupra trisomiilor autozomiale . *Ann. Hum. Genet.* (Londra) 44: 29-36.

Hassold, TJ și Hunt, P. 2001. A greși (meiotic) este uman: Geneza aneuploidiei umane. *Nat. Rev. Gen. 2:* 280-291.

Hassold, T. și Jacobs, P. A. 1984. Trisomia la om. *Annu. Rev. Ge net.* 18: 69-98.

Hecht, E. 1988. Situri fragile enigmatice pe cromozomii umani. *Trends Genet.* 4: 121-122.

Hulse, JH y Spurgeon, D. 1974. *Triticale. Sci. A.m.* (agosto) 231: 72-81.

Kaiser, P. 1984. Inversii pericentrice: Probleme și semnificație pentru genetica clinică. *Hum. Genet.* 68: 1-47.

Lewis, E. B. 1950. Fenomenul efectului de poziție . *Adv. Ge net.* 3: 73-115.

Lewis, WH, ed. 1980. *Poliploidia: Relevanță biologică.* Nueva York: Plenum Press.

Lynch, M. și Conery, J. S. 2000. Soarta evolutivă și consecințele genelor duplicate. *Science* 290: 1151-1154.

Madan, K. 1995. Inversii paracentrice: o trecere în revistă. *Hum. Genet.* 96: 503-515.

Nelson, DL și Gibbs, RA 2004. Regiunea critică în trisomia 21. *Science* 306: 619-621.

Ohno, S. 1970. *Evoluția prin duplicație genică.* Nueva York: Springer -Verlag.

Oostra, BA și Verkerk, A. J. 1992. Sindromul X fragil: izolarea genei *FMR-1* și caracterizarea mutației X fragil. *Chromosoma* 101: 381-387.

Patterson, D. 1987. Cauzele sindromului Down. *Sci. Am.* (înainte de) 257: 52-61.

Patterson, D. și Costa, A. 2005. Sindromul Down și genetica - Un caz de istorii legate. *Nature Reviews Genetics* 6: 137-145.

Shepard, J. și colab. 1983. Transfer genetic la plante prin fuziune interspecifică a protoplastelor. *Science* 21: 683-688.

Shepard, J. E 1982. Regenerarea plantelor de cartof din protoplaste . *Sci. Am.* (maio) 246: 154-166.

Stranger, BE și colab., 2007. Impactul relativ al variației nucleotidelor și a numărului de copii asupra fenotipurilor de expresie genică. *Science* 315: 848-854.

Taylor, A. 1. 1968. Sindroame de trisomie autosomală : Un studiu detaliat a 27 de cazuri de sindrom Edwards și 27 de cazuri de sindrom Patau . /. *Med. Genet.* 5: 227-252.

Tjio, J. H. și Levan, A. 1956. *Numărul* de cromozomi la om. *Hereditas* 42: 1-6 .

Wilkins, L. E., Brown, J. X. și Wolf, B. 1980. Dezvoltarea psihomotorie la 65 de copii crescuți acasă cu sindromul cri-du-chat . *J. Pediatr.* 97: 401-405.

Capitolul 9 Herencia extranuclear

Adams, K. L. și colab. 2000. Transferuri repetate, recente și diverse ale unei gene mitocondriale către nucleu la plantele cu flori. *Nature 408* : 354-357.

Choman, A. 1998. Epilepsia mioclonică și mutația fibrelor roșii zdrențuite oferă noi perspective asupra funcției și geneticii mitocondriale umane . *Am. J. Hum. Genet.* 62: 745-751.

Freeman, G. și Lundelius, J. W. 1982. Genetica dezvoltării dextralității și sinistrității la gastropoda *Lymnaea peregra. Wilhelm Roux Arch.* 191:69-83.

Gray, M. W., Burger, G. și Lang, B. 1999. Evoluția mitocondrială. *Science* 283: 1476-1481.

Green, B. R. și Burton, H. 1970. ADN-ul cloroplastului *din Acetabularia* : vizualizare microscopică electronică . *Știință* 168: 981-982.

Grivell, L. A. 1983. ADN mitocondrial. *Sci. Am.* (Mar.) 248:78-89.

He, Y. și colab. 2010. Mutații heteroplasmatice ale ADN-ului mitocondrial în celulele normale și tumorale . *Nature* 464: 610-614.

Hiendleder, S. 2007. Moștenirea ADN-ului mitocondrial după SCNT. *Adv. Exp. Med Biol.* 591: 103-116.

Ishikawa, K. 2008. Mutațiile ADN-ului mitocondrial generatoare de ROS pot regla metastaza celulelor tumorale . *Science* 320: 661-664.

Larson, N. G. și Clayton, DA 1995. Aspecte genetice moleculare ale tulburărilor mitocondriale umane. *Ann. Rev. Genetică* 29: 151-178.

Margulis, L. *1970.* Originea *celulelor eucariote* . New Haven, CT: Yale University Press.

Mitchell, MB și Mitchell, HK 1952. Un caz de moștenire maternă la *Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci.* (*SUA)* 38: 442-449.

Nüsslein-Volhard. C. 1996. Gradienți care organizează dezvoltarea embrionilor . *Știință. Am.* (august) 275: 54-61.

Preer, J. R. 1971. Moștenire extracromozomială: Simbionti ereditari , mitocondrii, cloroplaste. *Annu. Rev. Genet.* 5: 361 406.

Sager, R. 1965. Gene în afara cromozomilor. *Sci. Am.* (ene ro) 212: 70-79.

Sager, R. 1985. Genetica cloroplastelor . *BioEssays* 3: 180-184.

Schwartz, RM și Dayhoff, MO 1978. Originile procariotelor, eucariotelor, mitocondriilor și cloroplastelor. *Science* 199: 395-403 .

Sonneborn, TM 1959. Kappa și particule înrudite în *Parame cium. Adv. Virus Res.* 6: 229-256.

Sturtevant, AH 1923. Moștenirea direcției de înfășurare în *Limnaea. Science* 58: 269-270.

Taylor, RW și Turnbull, DM, 2005. Mutațiile ADN-ului mitocondrial în bolile umane. *Nature Reviews Genetics* 6: 389-402.

Wallace, DC 1997. ADN-ul mitocondrial în îmbătrânire și boli. *Sci. Am.* (august) 277: 40-59.

Wallace, DC 1999. Boli mitocondriale la om și șoarece. *Science 283:* 1482-1488.

Capitolul 10 Estructura și analiza ADN

Adleman, LM 1998. Calcul cu ADN. *Sci. Am.* (august) 279: 54-61.

Alloway, JL 1933. Observații suplimentare privind utilizarea extractelor de pneumococcus în efectuarea transformării tipului *in vitro. J. Exp. Med.* 57: 265-278.

Avery, OT, MacLeod, CM și McCarty, M. 1944. Studii asupra naturii chimice a substanței care induce transformarea tipurilor de pneumococ: Inducerea transformării printr-o fracțiune de acid desoxiribonucleic izolată din pneumococ de tip III. J. Exp. Med. 79: 137-158. (Reimprimat de Taylor, J.)

H. 1965. *Lucrări selectate de genetică moleculară.* Orlando, FL: Academic Press.)

Britten, RJ și Kohne, DE 1968. Secvențe repetate în ADN. *Science* 161: 529-540.

Chargaff, E. 1950. Specificitatea chimică a acizilor nucleici și mecanismul de degradare enzimatică a acestora. *Experientia* 6:201-209 .

Darnell, JE 1985. ARN. *Sci. A.m.* (octubre) 253: 68-87.

Dawson, MH 1930. Transformarea tipurilor de pneumococ:

I. Interconvertibilitatea *pneumococilor S. specifici tipului. J. Exp. Med.* 51: 123-147.

Dickerson, RE și colab. 1982. Anatomia ADN-ului A, B și Z. *Science* 216: 475-485.

Dubos, R. J. 1976. Profesorul, Institutul și ADN-ul: Oswald T. Avery, viața și realizările sale științifice. Nueva York: Rockefeller University Press.

Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. A.m.* (octubre) 253: 58-78.

Franklin, RE și Gosling, R. G. 1953. Configurația moleculară în timonucleatul de sodiu. *Nature* 171: 740-741.

Griffith, F. 1928. Semnificația tipurilor de pneumococ. *I. Hyg.* 27: 113-159.

Guthrie, GD și Sinsheimer, R. L. 1960. Infecția protoplastelor de *Escherichia coli* cu particule subvirale. *J. Mol. Biol.* 2: 297-305.

Hershey, A.D. și Chase, M. 1952. Funcții independente ale proteinei virale și ale acidului nucleic în creșterea bacteriofagului. *J. Gen. Phys.* 36: 39-56. (Reimprimat de Taylor, J. H. 1965. *Lucrări selectate de genetică moleculară.* Orlando, FL: Academic Press.)

Levene, P. A. și Simms, H. S. 1926. Structura acidului nucleic determinată prin date de titrare electrometrică. *J. Biol. Chem.* 70: 327-341.

McCarty, M. 1985. *Principiul transformarii: descoperirea faptului că genele sunt alcătuite din ADN.* Nueva York: W. W. Norton.

Olby, R. 1974. *Calea către dubla helix.* Seattle: Editura Universității din Washington .

Pauling, L. și Corey, R. B. 1953. O structură propusă pentru acizii nucleici. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 39: 84-97.

Rich, A., Nordheim, A. și Wang, A. H.-J. 1984. Chimia și biologia ADN-ului Z stângaci. *Annu. Rev. Biochem.* 53:791-846.

Spizizen, J. 1957. Infecția protoplastelor cu virusuri T2 perturbate . *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA*) 43: 694-701.

Varmus, H. 1988. Retrovirusuri. *Science* 240: 1427-1435.

Watson, JD 1968. *Dubla helix* . New York: Ateneul.

Watson, J. D. și Crick, F. C. 1953a. Structura moleculară a acizilor nucleici: o structură pentru acizii nucleici dezoxiribozici . *Nature* 171: 737-738.

Watson, J. D. și Crick, F. C. 1953b. Implicații genetice ale structurii acidului nucleic dezoxiribozic . *Nature* 171: 964.

Wilkins, MH E, Stokes, AR și Wilson, HR 1953. Structura moleculară a acizilor nucleici dezoxipentozici . *Nature* 171: 738-740.

Capitolul 11 Replicarea și recombinarea ADN-ului

Blackburn, E. H. 1991. Structura și funcția *telomerilor* . *Nature* 350: 569-572.

DeLucia, P. y Cairns, J. 1969. Isolation of an *E. coli* tulpină cu o mutație care afectează ADN polimeraza. *Natură* 224: 1164 1166.

Gilbert, D. M. 2001. Înțelegerea originilor replicării ADN-ului eucariot . *Science* 294: 96-100.

Greider, C. W. 1996. Telomeri, telomerază și cancer. *Sci. Am.* (februarie) 274: 92-97.

Greider, C. W. 1998. Activitatea telomerazei , proliferarea celulară și cancerul. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 95: 90-92.

Holliday, R. 1964. Un mecanism pentru conversia genică la ciuperci. *Ge net. Res.* 5: 282-304.

Holmes, F. L. 2001. Meselson, Stahl și replicarea ADN-ului: O istorie a „celui mai frumos experiment din biologie". New Haven, CT: Yale University Press.

Kim, J., Kam , Inker, P. și Campisi , 2002. Telomeri, îmbătrânire și cancer : În căutarea unui final fericit. *Oncogene* 21: 503-511.

Kornberg, A. 1960. Sinteza biologică a ADN-ului. *Science* 131:1503-1508 .

Kornberg, A. și Baker, T. 1992. *Replicarea ADN-ului , 2.* ª și New York: W. H. Freeman.

Krogh, B. O. și Symington, L.S. 2004. Proteine de recombinare la drojdie. *Ann. Rev. Genet.* 38: 233-271.

Luke, B. y Linguer, J. 2009. TERRA: Telomere repeatcontaining ARN. *EM BO /.* 28: 2503-2510.

Meselson, M. și Stahl, F. W. 1958. Replicarea ADN-ului la *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 44: 671-682.

Mitchell, M. B. 1955. Recombinarea aberantă a mutanților de piridoxină din *Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 41: 215-220 .

Okazaki, T., și colab . 1979. Structura și metabolismul primerului ARN în replicarea discontinuă a ADN- ului procariot. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 203-222.

Radman, M. și Wagner, R. 1988. Fidelitatea ridicată a duplicării ADN-ului . *Sci. Am.* (august) 259: 40-46.

Radman, M. și Wagner, R. 1987. Recombinare genetică. *Sci. Am.* (februarie) 256:90-101.

Redon, S., și colab., 2010. ARN-ul necodificator TERRA este un ligand natural al telomerazei umane. *Nucleic Acid Res.* 38: 5797-5806.

Takeda, DY și Dutta, A. 2005. Replicarea și progresia ADN-ului prin faza S. *Oncogene* 24: 2827-2843.

Taylor, J. H.» Woods, PS și Hughes, WC 1957. Organizarea și duplicarea cromozomilor relevate prin studii autoradiografice utilizând timidină marcată cu tritiu. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA) 48-.* 122-128.

Wang, JC 1987. Studii recente asupra ADN-topoizomerazelor. *Biochim. Biophys. Acta* 909: 1-9 .

Whitehouse, HLK 1982. Recombinarea genetică: Înțelegerea mecanismelor. Nueva York: Wiley.

Capitolul 12 Organizația ADN în cromozoamele

Angelier, N. și colab. 1984. Microscopie electronică cu scanare a cromozomilor lampbrush de amfibieni. *Chromosoma* 89: 243-253.

Beerman, W. și Clever, U. 1964. Pufuri cromozomiale. *Sci. Am.* (aprilie) 210: 50-58.

Carbon, J. 1984. Centromerii drojdiei: Structură și funcție. *Cell* 37: 352-353.

Chen, TR și Ruddle, F. H. 1971. Analiza cariotipului utilizând heterocromatina constitutivă diferențială colorată a cromozomilor umani și murini. *Chromosoma* 34: 51-72.

DuPraw, EJ 1970. *ADN și cromozomi.* Nueva York: Holt, Ri nehart și Winston.

Gall, JG 1981. Structura cromozomilor și paradoxul valorii C. *J. Cell Biol.* 91: 3s-14s.

Hewish, D. R. și Burgoyne, L. 1973. Substructura cromatinei. Digestia ADN-ului cromatinei în situsuri distanțate regulat de către o dezoxiribonuclează nucleară. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 52: 504-510.

Korenberg, JR și Rykowski, MC 1988. Organizarea genomului uman : *Alu,* LINES și organizarea moleculară a benzilor cromozomiale metafazice. *Cell* 53: 391-400.

Kornberg, RD 1975. Structura cromatinei: o unitate repetitivă a histonei și ADN-ului. *Science* 184: 868-871.

Kornberg, RD și Klug, A. 1981. Nucleosomul. *Sci. Am.* (februarie) 244: 52-64.

Lorch, Y. și colab. 2006. Remodelarea cromatinei prin dezasamblarea nucleozomilor in *vitro. Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 3090-3093.

Luger, K. și colab., 1997. Structura cristalină a particulei centrale a nucleozomului la o rezoluție de 2,8. *Nature* 389: 251-256.

Moyzis, RK 1991. Telomerul uman . *Sci. Am.* (Agosto.) 265:48-55.

Olins, AL și Olins, DE 1974. Unități de cromatină sferoide (corpuri v). *Science* 183: 330-332.

Olins, A. L. și Olins, D. 1978. Nucleozomii: cuantumul structural din cromozomi . *Am. Sci.* 66: 704-711.

Singer, MF 1982. SINUSURI și LINII: Secvențe intercalate scurte și lungi, foarte repetate, în genomurile mamiferelor. *Cell* 28: 433-434.

Capitolul 13 Codul genético și transcripția

Barrell, BG, Air, G. și Hutchinson, C. 1976. Gene suprapuse în bacteriofagul d»X174. *Nature* 264: 34-40.

Barrell, B. G., Banker, A. T. și Drouin, J. 1979. Un cod genetic diferit în mitocondriile umane. *Nature* 282: 189-194.

Bass, B. L., ed. 2000. Editarea *ARN-ului* . Oxford: Oxford University Press.

Brenner, S., Jacob, F. și Meselson, M. 1961. Un intermediar instabil care transportă informații de la gene la ribozomi pentru sinteza proteinelor. *Nature* 190: 575-580.

Brenner, S., Stretton, AOW și Kaplan, D. 1965. Cod genetic : Tripletele fără sens pentru terminarea lanțului și suprimarea acestora. *Nature* 206: 994-998.

Cattaneo, R. 1991. Diferite tipuri de editare a ARN-ului mesager. *Annu. Rev. Genet. 25:* 71-88.

Cech, T. R. 1986. ARN-ul ca enzimă. *Sci. Am.* (noiembrie) 255(5): 64-75.

Cech, TR 1987. Chimia ARN-ului și a enzimelor ARN care se auto-impiseză . Science *236* :1532-1539.

Chambón, P. 1981. Split genes. *Sci. A.m.* (maioneză) 244: 60-71.

Cramer, P. și colab. 2000. Arhitectura ARN polimerazei II și implicații pentru mecanismul de transcripție. *Science* 288: 640-649.

Crick, FHC 1962. Codul genetic . *Sci. Am.* (octombrie) 207: 66-77.

Crick, F. H. C. 1966a. Codul genetic: III. *Știință. Am.* (octombrie) 215: 55-63.

Crick. F. HC 1966b. Împerecherea codon-anticodon: Ipoteza oscilației . J. *Mol. Biol.* 19: 548-555.

Crick, F. HC, Barnett, L., Brenner, S. și Watts-Tobin, RJ 1961. Natura generală a codului genetic pentru proteine. *Nature* 192: 1227-1232.

Darnell , J. E. 1983. Procesarea ARN . *Sci. A.m.* (octombrie) 249:90-100.

Dickerson, R. E. 1983. Helixul ADN -ului și cum este citit. *Sci. Am.* (decembrie) 249: 94-111.

Dugaiczk, A., și colab. 1978. Gena naturală a ovalbuminei conține șapte -secvențe intermediare. *Nature 274: 328-333.*

Fiers, W. și colab., 1976. Secvența completă de nucleotide a ARN-ului MS2 al bacteriofagului : structura primară și secundară a genei replicazei . *Nature* 260: 500-507.

Gamow, G. 1954. Posibilă relație între structurile ADN-ului și cele ale proteinelor . *Nature* 173: 318.

Hall, B. D. și Spiegelman, S. 1961. Complementaritatea secvenței ADN -ului T2 și a ARN-ului specific T2. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA) 47:* 137-146.

Hamkalo, B. 1985. Vizualizarea transcripției în cromozomi. *Trends Genet.* 1: 255-260.

Khorana, HG 1967. Sinteza polinucleotidelor și codul genetic. *Harvey Lectures 62:* 79-105.

Makalowska, L. și colab. 2005. Gene suprapuse în genomurile vertebratelor . *Comput Biol Chem.* 29:1-12.

Miller, O. L. Hamkalo, B. și Thomas, C. 1970. Vizualizarea genelor bacteriene în acțiune . *Știință* 169: 392-395.

Nirenberg, MW 1963. Codul genetic : IL *Sci. Am.* (Martie) 190: 80-94.

O'Malley, B. și colab., 1979. O comparație a organizării secvențiale a genelor ovalbuminei și ovomucoidelor la pui. În *„Eucaryotic gene regulation",* R. Axel și colab., eds., pag. 281-299. Orlando, FL: Academic Press.

Reed, R. și Maniatis, T. 1985. Secvențe de introni implicate în formarea lariatelor în timpul splicingului pre-ARNm. *Cell* 41:95-105.

Ridley, M., 2006. Francis Crick: Descoperitorul codului genetic. Nueva York: HarperCollins.

Roberts, JW 2006. ARN polimeraza: o mașină de mărunțit. *Science* 314:1097-1098.

Sharp, PA 1994. Prelegerea Premiului Nobel: Genele divizate și splicing-ul ARN-ului. *Cell* 77: 805-815.

Steitz, JA 1988. Snurps. *Sci. A.m.* (junio) 258(6): 56-63.

Volkin, E. și Astrachan, L. 1956. Incorporarea fosforului în acizii ribonucleici *de E. coli* după infecția cu bacteriofagul T2. *Virology!:* 149-161.

Watson, JD 1963. Implicarea ARN-ului în sinteza proteinelor . *Science* 140:17-26.

Mașina ARN polimerazei II : Structura ilumineză funcția. *Cell* 108: 453-464.

Capitolul 14 Traducere și proteine

Anfinsen, CB 1973. Principii care guvernează plierea lanțurilor proteice. *Science* 181: 223-230.

Atkins, JF și Baranov, PV 2007. Dualitatea în codul genetic. *Nature 448* : 1004-1005.

Bartholome, K. 1979. Genetica și biochimia fenilcetonuriei - Starea actuală. *Hum. Genet.* 51: 241-245.

Beadle, GW și Tatum, E. L. 1941. Controlul genetic al reacțiilor biochimice la *Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 27: 499-506.

Beet, EA 1949. Genetica trăsăturii de anemie falciformă la un trib Bantu . *Ann. Eugenics* 14: 279-284.

Ben-Sham, A. 2010. Structura cristalină a ribozomului eucariot. *Science* 330: 1203-1208.

Brenner, S. 1955. Biosinteza triptofanului la *Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 41: 862-863.

Doolittle, RF 1985. Proteins. Sci. *Am.* (octombrie) 253: 88-99.

Fischer, N. și colab. 2010. Dinamica ribozomilor și mișcarea ARNt prin criomicroscopie electronică rezolvată în timp. *Nature* 466: 329-336.

Frank, J. 1998. Cum funcționează ribozomul. *Amer. Scient.* 86:428-439.

Garrod, AE 1902. Incidența alcaptonuriei: Un studiu asupra individualității chimice. *Lancet 2:* 1616-1620.

Garrod, A. E 1909. *Erori congenitale ale metabolismului.* Londra: Oxford University Press. (Reimprimat în 1963, Oxford University Press, Londra.)

Garrod, SC 1989. Influențele familiei asupra gândirii lui A. E. Garrod. *J. Inher. Metab. Dis.* 12: 2-8.

Ingram, VM 1957. Mutații genetice în hemoglobina umană: Diferența chimică dintre hemoglobina normală și cea cu celule falciforme . *Nature* 180: 326-328.

Koshland, DE 1973. Forma și controlul proteinelor. *Sci. Am.* (octombrie) 229: 52-64.

Lake, J. A. 1981. Ribozomul. *Sci. Am.* (august) 245: 84-97.

Maniatis, T. și colab. 1980. Genetica moleculară a hemoglobinelor umane . Annu. *Rev. Fr. Genet.* 14: 145-1

Neel, JV 1949. Moștenirea anemiei falciforme. *Știință* 1 10:64-6

Nirenberg, MW și Leder, P. 1964. Cuvinte de cod ARN și sinteza proteinelor. *Science* 145: 1399-1407.

Nomura, M. 1984. Controlul sintezei ribozomilor. *Sci. Am.* (ianuarie) 250: 102-114.

Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. și Wells, I. C. 1949. Anemia falciformă: o boală moleculară. *Știință* 110: 543-548.

Ramakrishnan, V. 2002. Structura ribozomilor și mecanismul translației. *Cell* 108: 557-572.

Rich, A. și Houkim, S. 1978. Structura tridimensională a ARN-ului de transfer. *Sci. Am.* (ianuarie) 238: 52-62.

Rich, A., Warner, J. R. și Goodman, HM 1963. Structura și funcția poliribozomilor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 269-285.

Richards, F. M. 1991. Problema plierii proteinelor . *Știința Am.* (ene ro) 264: 54-63.

Rould, MA și colab. , 1989. Structura *E. coli* glutaminil-ARNt sintetază - complexată cu ARNt ^{Gln} și ATP la o rezoluție de 2,8. *Science* 246: 1135-1142.

Srb, AM și Horowitz, N. H. 1944. Ciclul ornitinei în *Neuros pora* și controlul său genetic. *I. Biol. Chem.* 154:129-139.

Warner, J. și Rich, A. 1964. Numărul de molecule de ARN solubile de pe poliribozomii reticulocitari . *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 51: 1134-1141.

Wimberly, B. T. și colab. 2000. Structura subunității ribozomale 30S . Nature 407: 327-333.

Yuan, J., și colab. 2010. Strategii distincte de expansiune a codului genetic pentru selenocisteină și pirolizină se reflectă în diferite sisteme de formare a aminoacil-ARNt . *FEBS Lett:* 584:342-349.

Yusupov, M. M., et al. 2001. Structura cristalină a ribozomului la o rezoluție de 5,5 A. *Science* 292: 883-896.

Capitolul 15 Mutarea genética, repararea ADN și transpunerea

Arnheim, N. și Calabrese, P. 2009. Înțelegerea factorilor care determină - frecvența și modelul mutațiilor germinale umane. *Nature Rev. Genetics* 10:478-488.

Cairns, J., Overbaugh, J. și Miller, S. 1988. Originea mutanților. *Nature* 335: 142-145.

Cleaver, JE 2005. Cancer în xeroderma pigmentosum și tulburări conexe ale reparării ADN-ului. *Nature Reviews Cancer* 5:564-571.

Comfort, N. C. 2001. Câmpul încălcit: căutarea Barbara McClintock pentru tiparele controlului genetic . Cambridge, MA: Harvard University Press.

Ellegren, H., Smith, NG, C și Webster, MT 2003. Variația ratei de mutație în genomul mamiferelor . *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 562-568.

Jiricny, J. 1998. Repararea nepotrivirilor eucariote: o actualizare. *Mutation Research 409:* 107-121.

Luria, SE și Delbrück, M. (1943). Mutații ale bacteriilor de la sensibilitatea la virus la rezistența la virus. *Genetică* 28(6):491-511.

Mirkin, SM 2007. Repetiții ADN extensibile și boli umane. *Nature* 447: 932-940.

Mortelmans, K. și Zeigler, E. 2000. Testul Ames de mutagenitate a *Salmonella/microzomilor* . Mutation *Research* 455: 29-60.

O'Driscoll, M. și Jeggo, PA 2006. Rolul reparării rupturilor duble catenare - perspective din genetica umană. *Nature Reviews Genetics 7* : 45-51.

O'Hare, K. 1985. Mecanismul și controlul poziției trans a elementului P la *Drosophila. Trends Genet.* 1: 250-254.

Rosenberg, SM 2001. Evoluție responsivă: mutație adaptivă. *Nature Rev. Genetics* 2: 504-515.

Capitolul 16 Reglementarea expresiei genice în procariotas

Antson, AA și colab. 1999. Structura proteinei de atenuare a legării ARN-ului trp, TRAP, legată de ARN. *Nature* 401: 235-242.

Beckwith, J. R. și Zipser, D., eds. 1970. *Operonul lactozei.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bertrand, K. și colab. 1975. Noi caracteristici ale reglării operonului triptofan. *Science* 189: 22-26.

Breaker, Ronald R. 2008. Ribocomutatoare complexe. *Science* 319:1795-1797 .

Gilbert, W. și Muller-Hill, B. 1966. Izolarea represorului *lac* . *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 56: 1891-1898.

—. 1967. Operatorul *lac* este ADN-ul. *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 58: 2415-2421.

Jacob, E. și Monod, J. 1961. Mecanisme de reglare genetică în sinteza proteinelor. J. *Mol. Biol.* 3: 318-356.

Lewis, M. și colab., 1996. Structura cristalină a represorului operonului lactoză și a complexelor sale cu ADN și inductor. *Science* 271: 1247-1254.

Maumita, M. și colab. 2003. Comutatoarele ribo controlează căile biochimice fundamentale la *Bacillus subtilis* și alte bacterii. *Cell* 113: 577-586.

Serganov, A. 2009. Aspectele lungi și scurte ale ribocomutatorilor. *Curr Opin Struct Biol.* 19: 251-259.

Stroynowski, I. și Yanofsky, C. 1982. Structurile secundare ale transcrierilor reglează terminarea transcrierii la atenuatorul operonului triptofan din S. *marcescens* . *Nature 298: 34-38.*

Vaibuzzi, A. și Yanofsky, C. 2001. Inhibarea proteinei reglatoare TRAP din *B. subtilis* de către proteina inhibitoare TRAP, AT. *Science* 293: 2057–2061.

Yanofsky, C. 1981. Atenuarea controlului expresiei operonilor bacterieni. *Nature* 289: 751–758.

Capitolul 17 Reglarea expresiei genelor la eucariote

Alt, E. W. și colab. , 1987. Dezvoltarea repertoriului de anticorpi primari . *Science* 238: 1079-1087.

Becker, PB și Hòrz, W. 2002. Removalarea nucleozomilor dependentă de ATP . *Annu. Rev. Biochem.* 71: 247-273.

Black, DL 2000. Diversitatea proteinelor prin splicing alternativ: o provocare pentru bioinformatică și biologie postgenomică. *Cell* 103: 367-370.

Black, DL 2003. Mecanisme de splicing alternativ al pre-ARNm. *Annu. Rev. Biochem. 72:* 291-336.

Bumcrot, D., și colab. 2006. Terapii ARNi: o potențială nouă clasă de medicamente farmaceutice. *Nature Chemical Biology 2:* 711-718 .

Henikoff, S. 2008. Destabilizarea nucleozomilor în reglarea epigenetică a - expresiei genelor. *Nature Reviews Genetics 9:* 15-20.

Jackson, D. A. 2003. Anatomia situsurilor de transcripție. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:311-317.

Juven-Gershon, T. și Kadonaga, J. T. 2009. Reglarea expresiei genelor prin intermediul promotorului central și al mecanismului transcripțional bazal . Dev . *Biol.* 339: 225-229.

Licatalosi, DD și Darnell, RB 2010. Prelucrarea ARN-ului și reglarea acestuia : perspective globale asupra rețelelor biologice. *Nature Rev. Genetics* 11: 75-87.

Mello, C. C. și Conte, D., Jr. 2004. Dezvăluirea lumii ARN-ului în interferență. *Nature* 431: 338-342. Newbury, S. E 2006. Controlul stabilității ARNm la eucariote. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 30-34.

Rana, T. M. 2007. Iluminând tăcerea : înțelegerea structurii și funcției ARN-urilor mici. *Nature Mol. Cell Biol.* 8: 23-34.

Turner, BM 2000. Acetilarea histonei și un cod epigenetic . *Bioessays 22:* 836-845.

Wheeler, TM și Thornton, C. A. 2007. Distrofia miotonică: boală musculară mediată de ARN. *Curr. Opin. Neurol.* 20: 572-576.

Capitolul 18 Genética del desarrollo

Davidson, E. H. și Levine, M. S. 2008. Proprietățile rețelelor de reglare a genelor de dezvoltare . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 115:20063 20066.

De Leon, S. BT. și Davidson, E. H. 2007. Reglarea genelor : Rețele de control genetic în dezvoltare. *Annu. Rev. Biophys. Biomol . Struct.* 36: 191-212.

Feng, S., Jacobsen, SE y Reik, W. 2010. Reprogramarea epigenetică în dezvoltarea plantelor și animalelor. *Știință* 330: 622 627.

Goodman, E 2002. Malformațiile membrelor și genele *HOX* umane . *Am. J. Med. Genet.* 112: 256-265.

Gridley, T. 2003. Semnalizarea Notch și bolile umane moștenite. *Hum. Mol. Genet.* 12: R9-R13.

Inoue, T, *și colab.* 2005. Caracteristică specială de reglare genetică : Rețeaua transcripțională care stă la baza dezvoltării vulvei *la Caenorhabditis elegans* . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102:4972-4977.

Kestler, H. A., Wawra, C., Kracher, B. și Kuhl, M. 2008. Modelarea rețelei de transducție a semnalului: Stabilirea perspectivei globale. *Bioeseuri* 30: 1110-1125.

Krizek, BA și Fletcher, JC 2006. Mecanisme moleculare ale dezvoltării florilor : Un ghid practic. *Nat. Rev. Genet. 6:* 688-698.

Lynch, J. A. și Roth, S. 2011. Evoluția mecanismului de modelare dorso-ventrală la insecte. *Genes Dev.* 25: 107-118.

Maeda, RK și Karch, F. 2006. ABC- ul BX -C: Complexul bithorax explicat. *Development* 133: 1413-1422.

Nüsslein-Volhard, C. și Weischaus, E. 1980. Mutații care afectează numărul de segmente și polaritatea la *Drosophila. Nature* 287: 795-801.

Reyes, JC 2006. Modificatori ai cromatinei care controlează dezvoltarea plantelor . *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 21-27.

Schroeder, MD și colab., 2004. Controlul transcripțional în rețeaua genetică de segmentare a *Drosophila. PLOS Biol.* 2: 1396-1410 .

Schvartsman, S. Y, Coppey, M. și Berezhkovskii, A. 2008. Dinamica - gradienților morfogenici materni la *Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 342-347.

Verakasa, A., Del Campo, M. și McGinnis, W. 2000. Dezvoltarea genelor de modelare mentală și funcțiile lor conservate: de la organisme model la oameni. *Mol. Genet. Metabol.* 69: 85-100.

Wang, M. și Sternberg, PW 2001. Formarea tiparelor în timpul inducției vulvare *la C. elegans* . *Curr. Top. Dev. Biol.* 51:189-220.

Yuan, J. și Kroemer, G. 2010. Mecanisme alternative ale morții celulare în dezvoltare și nu numai. *Genes Dev.* 24: 2592-2602.

Capitolul 19 Cancer și reglementare a ciclului celular

Alison, MR și colab. 2010. Celulele stem în cancer: instigatori și propagatori? *J. Celi Sci.* 123: 2357-2368.

Bernards, R. și Weinberg, RA 2002. Un puzzle cu progresie. *Nature 418* : 823.

Brown, MA 1997. Genele supresoare tumorale și cancerul uman. *Adv. Genet.* 36:45-135.

Compagni, A. și Christofori, G. 2000. Progrese recente în cercetarea tumorogenezei în mai multe etape. *Brit. J. Cancer* 83:1-5.

Esteller, M. 2007. Epigenomica cancerului: metilomi ADN și hărți de modificare a histonului. *Nature Reviews Cancer* 8: 286-297.

Futreal, PA și colab. 2004. Un recensământ al genelor cancerului uman. *Nature Reviews Cancer* 4: 177-183.

Gray, J. 2010. Genomica metastazelor. *Nature* 464: 989-990.

Hartwell, LH și Kastan, MB 1994. Controlul ciclului celular și cancerul. *Science* 266:1821-1827.

Ledford, H. 2010. Provocarea genomului canceros. *Nature* 464:972-974 .

Lengauer, C.» Kinzler, KW și Vogelstein, B. 1997. Instabilitate genetică în cancerul colorectal. *Nature* 386:623-627.

Nurse, P. 1997. Căile de control devin majore. *Cell* 91: 865-867 .

Sherr, CJ 1996. Ciclurile celulelor canceroase. *Science* 274:1672-1677.

Varmus, H. 2006. Noua eră în cercetarea cancerului. *Science* 312: 1162-1164.

Vazquez, J. și colab. 2008. Genetica căii p53, apoptoza și terapia cancerului. *Nature Reviews Drug Discov. 7:* 979-987.

Vogelstein, B. și Kinzler, KW 1993. Natura multietapă a cancerului . *Trends in Genetics 9;* 138-141.

Yokota, J. 2000. Progresia tumorii și metastazele. *Carcinogenesis 21* : 497-503.

Capitolul 20 Tehnologia ADN recombinată

Brownlee, C. 2005. Danna și Nathans: Enzimele de restricție și avantajul biologiei moleculare moderne. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 5909.

Cohen, SN 1975. Manipularea genelor. *Sci. Am.* (ianuarie) 233: 24-33.

Mardis, ER 2008. Metode de secvențiere a ADN-ului de generație următoare. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 387-402.

Mardis, ER 2011. O perspectivă de decenii asupra tehnologiei de secvențiere a ADN-ului. *Nature,* 470: 198-203.

Mullis, KB 1990. Originea neobișnuită a reacției în lanț a polimerazei . *Știința americană.* (aprilie) 262: 56-65.

Rothberg, JM și Leamon, J. H. 2008. Dezvoltarea și impactul secvențierii 454. *Nat. Biotech.* 26: 1117-1124.

Sanger, E. și colab., 1977. Secvențierea ADN-ului cu inhibitori care termină lanțul . *Proc. Natl. Acad. Sci. (SUA)* 74: 5463-5467.

Shendure, J. și Ji, H. 2008. Secvențierea ADN-ului *de* generație următoare. *Nature Biotechnology.* 26:1135-1145.

Snyder, M.» Du, J. și Gerstein, M. 2010. Secvențierea genomului personal : Abordări și provocări actuale. *Genes & Development* . 24:423-431.

Southern, E. 1975. Detectarea secvențelor specifice printre fragmentele de ADN separate prin electroforeză în gel. *J. Mol. Biol.* 98: 503-507.

Capitolul 21 Genómica, bioinformatica y proteómica

Asara, J. M. și colab., 2007. Secvențe de proteine de la Mastodon și *Tyrannosaurus Rex* relevată prin spectrometrie de masă . *Science* 316: 280-285.

Chandonia, JM 2006. Impactul genomicii structurale: așteptări și rezultate. *Știință* 311: 347-351.

Church, GM 2006. Genomuri pentru toți. *Știința Am.* (ianuarie) 294: 47 54.

Conrad, D. E. și colab., 2010. Originile și impactul funcțional al variațiilor numărului de copii în genomul uman. *Nature* 464: 704 712.

Domon, B. și Aebersold, R. 2006. Spectrometrie de masă și analiza proteinelor. *Science* 312: 212-217.

Fleming, K. și colab. 2006. Proteomul : structură, funcție și evoluție. *Philos. Trans. R. Soc. bond. B Biol. Sci.* 361: 441-451 .

Green, R. E. și colab., 2008. O secvență completă a genomului mitocondrial neandertal determinată prin secvențiere de mare randament. *(voi)* 134:416 426.

Green, RE și colab. 2010. O schiță a secvenței genomului neandertal . *Science* 328: 710-722.

Hood, L.» Heath, J. R., Phelps, M. E. și Lin, B. 2004. Biologia sistemelor și noile tehnologii permit medicina predictivă și preventivă . *Știință* 306: 640-643.

Hoskins, R. A., et al., 2007. Finisarea secvenței și cartografierea heterocromatinei *Drosophila* me/anogaster. Science 316:1625-1628 .

Hugenholtz, P. și Tyson, GW 2008. Metagenomică. *Nature* 455: 481-483.

Internațional pentru Secvențierea Genomului Uman. 2001. Secvențierea inițială și analiza genomului uman . *Natur re* 409: 860-921.

Internațional pentru Secvențierea Genomului Uman. 2004. Finalizarea secvenței eucromatice a genomului uman. *Nature* 431:931-945.

Joyce, AR și Palsson, BO 2006. Organismul model ca sistem care integrează seturi de date «omice». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 901-909.

Lander, ES 201 1. Impactul inițial al secvențierii genomului uman . *Nature* 470: 187-197.

Loscalzo, J., Kohane, I. și Barabasi, AL. 2007. Clasificarea bolilor umane în era postgenomică: o abordare sistemică complexă a patobiologiei umane. *Molecular Systems Biology* 124: 32-42.

Nei, M. și Rooney, A. P. 2005. Evoluția concertată și evoluția nașterii și a morții în familiile multigene. *Annu. Rev. Genet.* 39: 197-218 .

Nezvizhskii, AI, Vitek, O. și Aebersold, R. 2007. Analiza și validarea datelor proteomice generate prin spectrometrie de masă în tandem. *Nature Methods* 4: 787-797.

Noonan, JP și colab. 2006. Secvențierea și analiza ADN- ului neanderthalian. Science 314:1113-1118.

Pennisi, E. 2006. Zorii genomicii din epoca de piatră. *Science* 314: 1068-1071.

Qin, J. și colab. 2010. Un catalog de gene microbiene umane stabilit prin secvențiere metagenomică. *Nature,* 464: 59-64.

Consorțiul pentru Secvențierea și Analiza Genomului Macacului Rhesus. 2007. Perspective evolutive și biomedicale din genomul macacului Rhesus. *Science* 316: 222-234.

Schweitzer, M. H„ și colab., 2007. Analizele țesuturilor moi de la *Tyrannosaurus rex* sugerează prezența proteinelor. *Science* 316:277-280.

Consorțiul pentru secvențierea genomului ariciului de mare. 2006. Genomul ariciului de mare *Strongyocentrotus purpuratus. Science* 314: 941-956.

Switnoski, M., Szczerbal, I. și Nowacka, J. 2004. Harta genomului câinelui și utilizarea sa în genomica comparativă a mamiferelor. *J. Appi. Physiol.* 45:195-214.

la scară populațională. *Nature* 467: 1061-1073.

Thieman, WJ și Palladino, MA 2009. *Introducere în biotehnologie ,* a 2- ª ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings.

Venter, JC și colab. 2001. Secvența genomului uman. Science 291: 1304-1351.

Venter, JC și colab. 2004. Secvențierea genomului de mediu prin metoda „shotgun " a Mării Sargaselor. *Science* 304:6-74.

Wong, D. T. 2008, Diagnosticuri salivare. *American Scientist,* 96:37-43.

Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D. B. Halpern, A.L., Williamson. S.J. și colab. 2007. Expediția globală de eșantionare oceanică - *Sorcerer II* : Extinderea universului familiilor de proteine. *PLoS Bio fogy* 'I 0432 0466.

Capitolul 22 Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei

Altshuler, D., Daly, MJ și Lander, ES 2008. Cartografierea genetică în bolile umane. *Science* 322: 881-888.

Cavazzanna-Calvo M. și colab. 2000. Terapia genică a bolii imunodeficienței combinate severe (SCID)-XI. *Science* 288:669-672.

Cavazzanna-Calvo, M., et al. 2010. Independența de transfuzie și activarea *HMGA2* după terapia genică a /-talasemiei umane . *Nature* 467: 318-322.

Chrispeels, MJ și Sadava, D. E. 2003. *Plante, gene și biotehnologia culturilor* . 2. º ed. Sudbury, MA: Jones and Barlett Publishers.

Colavito, M. C. 2007. *Terapia genică.* M. A. Palladino, ed. San Francisco , CA: Benjamin Cummings.

Collins, FS și Barker, AD 2007. Cartografierea genomului cancerului . *Scientific American* 296: 50-57.

Dykxhoorn, DM și Liberman, J. 2006. Combaterea bolilor cu siRNA-uri. *Cell* 126: 231-235.

Engler, O. B. și colab. 2001. Vaccinuri peptidice împotriva virusului hepatitei B: De la modelul animal la studii pe oameni. *Mol. Immunol.* 38: 457-465.

Friend, S. H. și Stoughton, R. B. 2002. Magia microarray-urilor. *Sci. Am.* (februarie) 286: 44-50.

Gibson, D. G., et al. 2010. Crearea unei celule bacteriene controlate de un genom sintetizat chimic. *Science* 329: 52-56.

Green, E. D. și Guyer, M. S. 2011. Trasarea unui curs pentru medicina genomică de la perechi de baze la patul pacientului. *Nature,* 470: 204-213.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M. și colab. 2003. Proliferarea clonală a celulelor T asociată cu LAf02 la doi pacienți după terapia genică pentru SCID-X1. *Știință,* 302: 415-419.

Knoppers, BM, Bordet, S. e Isasi, R. M. 2006. Diagnosticul genetic preimplantare: O privire de ansamblu asupra considerațiilor socio-etice și juridice . *Annu. Pr. Genoni. Zumzet. Genet.* 7: 201-221.

Manolio, T. A., și colab. 2009. Descoperirea ereditabilității lipsă a bolilor complexe . *Nature* 461: 747-753.

Schillberg, S., Fischer, T. și Emans, N. 2003. Cultivarea moleculară a - anticorpilor recombinați la plante. *Cell Mol. Life Sci.* 60:433-445.

Shastry, B. S. 2006. Farmacogenetica și conceptul de medicină individualizată. *Revista de Farmacogenetică* 6: 16-21.

Stix, G. 2006. Stăpânirea asupra elementelor vieții. *Sci. Am.* (februarie) 294: 76-83.

Wang, D. G., și colab. 1998. Identificarea, cartografierea și genotiparea la scară largă a polimorfismelor cu un singur nucleotid în genomul uman . *Science* 280: 1077-1082.

Whitelaw, C. B. A. 2004. Animale transgenice, ușor de gestionat. *Tendințe în biotehnologie* 22(4): 257-259.

Capitolul 23 Genética cuantitativă și caractere multifactoriale

Browman, K. W. 2001. Recenzie a metodelor statistice de ping al hărților QTL în încrucișări experimentale. *Lab Animal* 30:44-52.

Cong, B., Barrero, L. S. și Tanksley, SD 2008. Modificările de reglementare ale unui factor de transcripție de tip YABBY au dus la evoluția unor dimensiuni extreme ale fructelor în timpul domesticirii roșiilor. *Nat. Genet.* 40: 800-804.

Cong, B., Liu, J. și Tanksley, S. 2002. Alelele naturale la un locus al trăsăturilor cantitative ale mărimii fructului de tomate diferă prin mutații reglatoare heterocronice . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 13606-13611.

Crow, J. F. 1993. Francis Galton: Numără și măsoară, măsoară și numără. *Genetică* 135:1.

Druka, A. și colab. 2010. Exprimarea loci-urilor trăsăturilor cantitative prin analiza lor la plante. *Plant Biotech.* 8: 10-27.

Falconer, DS și Mackay, FC 1996. *Introducere în genetica cantitativă,* ed. a 4-a. Essex, Anglia: Longman.

Farber, S. 1980. *Gemeni identici crescuți separat.* Nueva York: Basic Books.

Feldman, M. W. și Lewontin, RC 1975. Problema cu ereditatea. *Science* 190: 1163-1166.

Frary, A., și colab. 2000. *fw2.2:* O trăsătură cantitativă cheie pentru evoluția dimensiunii fructelor de tomate. *Science* 289: 85-88.

Gupta, V. și colab. 2009. Analiza genomului și îmbunătățirea genetică a tomatelor. *Crit. Rev. Biotech.* 29: 152-181.

Haley, C. 1991. Utilizarea amprentelor ADN pentru detectarea genelor majore pentru trăsături cantitative la speciile domestice. *Anim. Genet.* 22: 259-277.

Haley, C. 1996. QTL-uri pentru animale: Aducând acasă slănina. *Trends Genet.* 11: 488-490.

Johnson, WE și colab. 2010. Restaurarea genetică a speciei Panthera palustris din Florida . *Science* 329: 1641-1644.

Kaminsky, AA și colab. 2009. Profiluri de metilare a ADN-ului la gemenii monozigoți și dizigoți. *Nat. Genet.* 41: 240-245.

Lander, E. și Botstein, D. 1989. Cartarea factorilor mendelieni care stau la baza trăsăturilor cantitative folosind hărți de linkage RFLP. *Genetics 121* : 185-199.

Lander, E. și Schork, N. 1994. Disecția genetică a trăsăturilor complexe. *Science* 265: 2037-2048.

Lynch, M. și Walsh, B. 1998. *Genetică și analiza trăsăturilor cantitative.* Sunderland. MA: Sinauer Associates.

Macy, TFC 2001. Loci cantitativi ai trăsăturilor la *Drosophila. Nature Reviews Genetics* 2: 11-19.

Newman, HH, Freeman, FN și Holzinger, KT 1937. *Gemenii: Un studiu al eredității și mediului.* Chicago: University of Chicago Press.

Paterson, A., Deverna, J. , Lanini, B. și Tanksley, S. 1990. Cartografierea fină a lociurilor trăsăturilor cantitative utilizând cromozomi recombinanți suprapuși selectați într-o încrucișare interspecifică de tomate. *Genetics* 124: 735-742.

Tanksley, SD 2004. Bazele genetice, de dezvoltare și moleculare ale variației mărimii și formei fructelor la tomate. *Plant Cell* 16: S181-S189.

Zar, JH 1999. *Analiză biostatistică,* ediția a 4-a. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Capitolul 24 Genetica comportamentului

Conrad, DF, Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y. și colab. 2010. Originea și impactul funcțional al variației numărului de copii în genomul uman. *Nature* 464: 704-712.

Davis, RL 2005. Formarea memoriei olfactive la *Drosophila:* De la neuroștiința moleculară la cea sistemică. *Annu. Rev. Neuros ci.* 28: 275-302.

Desbonnet, L., Waddington, JL și O'Tuathaigh, CM 2009. Modele mutante pentru genele asociate cu schizofrenia. *Bio chem. Soc. Trans.* 37: 308-312.

Dickson, B. J. 2008. Programat pentru sex: neurobiologia deciziilor de împerechere la *Drosophi la* . *Science* 322: 904-909.

Flint, J. și Shifman, S. 2008. Modele animale de boli psihiatrice. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 235-240.

Ganetzky, B. 1994. Șiruri de cisteină, canale de calciu și transmisie sinaptică. *BioEssays* 16: 461-463.

Hakak, Y., și colab. 2001. Analiza expresiei la nivelul întregului genom relevă disreglarea genelor legate de mielinizare în schizofrenia cronică. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 4746-4751.

Hovatta, I. și Barlow, C. 2008. Genetica moleculară a anxietății la șoareci și oameni. *Ann. Med.* 40: 92-109.

Mackay, T. F. C. și Anholt, R. H. 2006. Despre muște și om: *Drosophi la* ca model pentru trăsăturile complexe umane. *Annu. Rev. Hum. Ge net.* 7: 39-367.

Reddy, P. H., și colab. 1999. Șoareci transgenici care exprimă ADNc *HD mutat* pe întreaga lungime : o paradigmă pentru modificările locomotorii și - pierderea neuronală selectivă în boala Huntington. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B: 354: 1035-1045.

Ricker, *J.* P. și Hirsch, J. 1988. Modificări genetice care apar pe parcursul a 500 de generații în liniile de *Drosophila melanogaster* selectate divergent pentru geotaxie . *Comportament Genet.* 18:13-24.

Rockenstein, E., Crews, L. și Masliah, E. 2007. Modele animale transgenice de boli neurodegenerative și aplicarea lor în dezvoltarea tratamentelor. *Advanced Drug Del. Rev.* 59: 1093-1102.

Siegel, R. W., Hall, J. C., Gailey, D. A. și Kyriacou, CP 1984. Elemente genetice ale curtării la *Drosophila:* Mozaicuri și mutanți care învață. *Behav. Genet.* 14: 383-410.

Stoltenberg, SF, Hirsch, J. și Berlocher, SH 1995. Analiza corelațiilor a trei tipuri în linii selectate de *Drosophila melanogaster* care au dezvoltat o performanță geotactică extremă stabilă . J. Comp . *Psychol* . 105: 85-94.

Toma, D. P., White, K. P., Hirsch, J. y Greenspan, R. J. 2002. Identificarea genelor implicate în *Drosophila melanogaster* geotaxiuri , o pistă comportamentală complexă . *Nat. Genet.* 31: 349-353.

Tully, T. 1996. Descoperirea genelor implicate în învățare și memorie : o sinteză experimentală a perspectivelor hirschiene și benzeriene. *Proc. Nat. Acad. Sci. 93* : 13460-13467.

Turri, MG *și colab.* 2001. Analiza QTL identifică multiple dimensiuni comportamentale în testele etiologice ale anxietății la șoareci de laborator. *Curr. Biol.* 11 : 725-734.

Consorțiul Wellcome Trust Case Control. 2010. Studiu de asociere la nivelul întregului genom al CNV-urilor în 16.000 de cazuri din opt boli comune și 3.000 de controale comune. *Nature* 464: 713-722.

Willis-Owen, S. A. G. și Flint, J. 2006. Bazele genetice ale comportamentului emoțional la șoareci. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 721-728.

Capitolul 25 Genetica populațiilor și genetica evolutivă

Abzanhov, A. și colab., 2004. Bmp4 și variația morfologică a ciocurilor la cintezele lui Darwin. *Știință* 305: 1462-1465.

Ansari-Lari, MA, *și colab.* 1997. Gradul de variație genetică al genei *CCR5* . *Nature Genetics* 16: 221-222.

Carrington, M., Kissner, T. *și colab.* 1997. Noi alele ale genei receptorilor chemokine CCR5 . *Am. J. Hum. Genet.6İ:* 1261-1267.

Green, R. E. *și colab.* 2010. O schiță a secvenței genomului neandertal . *Science* 328: 710-722.

Karn, M. N. și Penrose, L. S. 1951. Greutatea la naștere și timpul de gestație în raport cu vârsta maternă, paritatea și supraviețuirea infantilă. *Ann. Eugen.* 16: 147-164.

Kerr, W. E. Wright, S. 1954. Studii experimentale privind distribuția frecvențelor genetice în populații foarte mici de *Droso phila melanogaster. Evolution* 8: 172-177 .

Knowlton, N. *și colab.* 1993. Divergență în proteine, ADN mitocondrial și compatibilitate reproductivă în Istmul Panama. *Science* 260: 1629-1632.

Kreitman, M. 1983. Polimorfismul nucleotidelor la locusul alcool de hidrogenază al *Drosophila melanogaster. Nature* 304: 412-417.

Lamb, RS și Irish, VF 2003. Divergență funcțională în cadrul liniilor genetice homeotice florale *APETALA3/PIST1LLATA* . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 6558-6563.

Leibert, E. și colab., 1998. Mutația *DCCR5* care conferă protecție împotriva HIV-1 în populațiile caucaziene are o origine unică și recentă în nord-estul Europei. *Hum. Moloc. Genet.* 7: 399-406.

Markow, T. *și colab.* 1993. Polimorfismul HLA la Havasupai: Dovezi pentru echilibrarea selecției. *Am. /. Hum. Genet.* 53:943-952 .

Noonan, J. P. *și colab.* 2006. Secvențierea și analiza ADN-ului genomic neanderthalian. *Science* 314: 1113-1118.

Presgraves, DC 2010. Bazele evoluției moleculare pentru formarea speciilor. *Nat. Rev. Genet.* 11: 175-180.

Rasmussen, M. *și colab.* 2010. Secvența genomului uman antic al unui paleo-eschimos dispărut. *Nature* 463: 757-762.

Reznick, DN și Ricklefs, RE 2009. Podul lui Darwin între microevoluție și macroevoluție. *Nature* 457: 837-842.

Salzburger, W. 2009. Interacțiunea dintre trăsăturile selectate sexual și natural în radiațiile adaptive ale peștilor ciclide. *Mol. Evol.* 18: 169-185.

Schulter, D. 2009. Dovezi ale speciației ecologice și alternativele acesteia . *Science* 323: 737-741.

Spinney, L. 2010. O nouă vizită la Dreampond. *Nature* 466: 174-175.

Stiassny, MLJ și Meyer, A. 1999. Ciclidele Lacurilor Rift. *Sci. Am.* (februarie) 280: 64-69.

Takahashi, K., *și colab.,* 1998. O nouă familie de elemente repetitive scurte intercalate (SINES) din ciclide: Modelul de inserție a SINES la loci ortologi susține monofilia propusă a patru grupuri majore de pești ciclizi din Lacul Tanganyika . *Mol. Biol. Evol.* 15: 391-407.

Yi, Z. *și colab.* 2003. O deleție de 122,5 kilobaze a genei *P* stă la baza prevalenței ridicate a albinismului oculocutanat de tip 2 în populația Navajo. *Am. J. Hum. Genet. 72:* 62-72.

Capitolul 26 Genetica de conservare

Baker, CS și Palumbi, SR 1994. Ce balene sunt vânate? O abordare genetică moleculară pentru monitorizarea vânătorii de balene. *Science* 265:1538-1539.

Daniels, S. J. și Walters, JR 2000. Depresia consangvină și efectele acesteia asupra dispersiei natale la ciocănitoarele cu cocoțată roșie . *Con dor* 102: 482-491.

Dobson, A. și Lyles, A. 2000. Recuperarea dihorului cu picioare negre. *Science 288: 985.*

Frankham, R. 1995. Genetica conservării . *Ann. Rev. Genet.* 29: 305-327.

Friar, EA și colab., 2001. Structura populației la *Argyroxiphium kauense* , o specie pe cale de dispariție a speciei Mauna Loa silversword . și influența sa la reintroducere . *Molecular Ecology* 10:1657-1663.

Gharrett, A. J. și Smoker, W. W. 1991. Două generații de hibrizi între somon roz *(Oncorhynchus gorbuscha)* din anii par și din anii impari : Un test pentru depresia asociată cu consanguinitatea ? *J. Fish. Aquatic. Sci. canadian* . 48: 426-438.

Hedrick, PW 2001. Genetica conservării: Unde ne aflăm acum? *Trends Ecol. Evol.* 16: 629-636.

Johnson, W. E. și colab. 2010. Restaurarea genetică a panterei din Florida . *Science* 329: 1641-1644.

Lacy, R. C. 1997. Importanța variației genetice pentru viabilitatea populațiilor de mamifere . *J. Mammalogy 78:* 320-335.

Moore, MK și colab. 2003. Utilizarea polimorfismelor de lungime a fragmentelor de restricție pentru identificarea ouălor de broaște țestoase marine și a cărnii gătite în funcție de specie. *Conserv. Genet.* 4: 95-103.

Paetkau, D. și colab. 1998. Variația diversității genetice în arealul ursilor bruni din America de Nord. Conserv . *Biol.* 12:418 429.

Ralls, K. și colab. 2000. Managementul genetic al condrodistrofiei la condorii din California . *Animal Conserv.* 3: 145-153.

Roman, J. și Bowen, B. W. 2000. Sindromul țestoasei false : Identificarea genetică a cărnii de țestoasă achiziționată în sud-estul Statelor Unite ale Americii. *Animal Conserv.* 3: 61-65.

Roman, J. și Palumbi, S. R. 2003. Balenele înainte de vânătoarea de balene în Atlanticul de Nord. *Science* 301: 508-510.

Wayne, RK și colab. 1991. Genetica conservării lupului cenușiu Isle Royale, o specie pe cale de dispariție. Conserv . *Biol. 5:* 41-51.

Wilson, E. O., ed. 1988. *Biodiversitate.* Washington, DC: Academia Națională de Științe.

Wynen, L.R. , și colab. 2000. Variația genetică post-focărie și structura populației la două specii de focă cu blană . *Mol. Ecol. 9:* 299-314.

Anexa B

RĂSPUNSURI LA PROBLEME SELECTATE

Capitolul 1

2. Pe baza paralelelor dintre modelul mendelian al moștenirii și comportamentul cromozomilor, a apărut teoria cromozomială a moștenirii. Aceasta afirmă că trăsăturile moștenite sunt controlate de gene situate pe cromozomi care sunt transmise de gameți.
4. O variantă genetică se numește alelă. Pot exista mai multe astfel de variante într -o populație.
6. Informația genetică este codificată în ADN prin secvența de baze.
8. 20^5.
10. Recent, biotehnologia a făcut posibilă manipularea genelor în diverse moduri pentru a genera plante transgenice. Aceste plante pot fi modificate genetic pentru a le crește aria ecologică, rezistența la boli și/sau valoarea nutritivă. Grâul, orezul, porumbul, fasolea și maniocul sunt modificate pentru a le îmbunătăți valoarea nutritivă prin creșterea conținutului de vitamine și minerale.
12. Atât genomica, cât și proteomica examinează componentele celulare. Genomica examinează ADN-ul, în timp ce proteomica examinează proteinele. Ambele discipline examinează structura și funcția acestor macromolecule în timp și spațiu în cadrul celulei. Pentru a gestiona volumul enorm de informații generate de genomică și proteomică, a apărut un alt domeniu relativ recent: bioinformatica. Bioinformatica implică dezvoltarea hardware-ului și software-ului necesare pentru procesarea, stocarea și analizarea unor cantități mari de date despre ADN și proteine.
14. Trebuie să existe un mecanism pentru a proteja investițiile persoanelor și instituțiilor care dezvoltă produse necesare și utile, cum ar fi segmente selectate de ADN uman. Cu toate acestea, trebuie dezvoltate și garanții etice și economice pentru a asigura accesul echitabil și relativ liber atunci când sunt în joc probleme care pun viața în pericol. Orice mecanism implementat va trebui să protejeze atât investitorii, cât și consumatorii.
16. Această întrebare lasă multe răspunsuri , în funcție de individ. Deși poate fi dificil să te pui în această poziție, gândește-te nu doar care ar fi decizia ta, ci și de ce ai lua-o. Adesea, pe măsură ce oamenii îmbătrânesc, perspectiva lor se schimbă. De exemplu, cum ți-ar influența decizia posibilitatea de a avea copii?
18. Aceste grupuri urmăresc să se asigure că comunitatea se implică și influențează aplicațiile guvernamentale și industriale ale biotehnologiei. Ei consideră că urmărirea profitului poate compromite beneficiile pe care le poate oferi această tehnologie . Ei pun la îndoială siguranța organismelor modificate genetic pentru sănătatea umană și armonia ecologică , ca să nu mai vorbim de aplicațiile biotehnologice pentru dezvoltarea de arme .

Capitolul 2

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

2.1 (a) 32, (b) 16

2.2 (a) 8, (b) 8, (c) 8

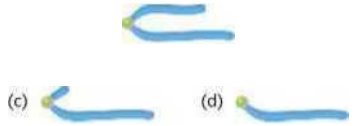
2.3 Nu neapărat; dacă încrucișarea are loc în timpul meiozei I, atunci cromatidele din ovocitul secundar nu sunt identice. Odată ce se separă în timpul meiozei II, acele cromatide diferite se vor găsi în ootidă și în al doilea corp polar.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. (a) Cromatina conține materialul genetic responsabil pentru menținerea informației ereditare (de la o celulă la celulele fiice și de la o generație la alta) și pentru producerea fenotipului .
   (b) Nucleolusul este o *structură* produsă de activitatea regiunii organizatoare nucleolare la eucariote. Compusă din ADN ribozomal și proteine, este structura utilizată pentru producerea ribozomilor.
   (c) Ribozomul *este* Structura în care diversele ARN-uri, enzime și alte molecule asamblează secvența principală a unei proteine. Adică, aminoacizii sunt plasați în ordine, așa cum este specificat de ARN - ul mesager.
   (d) Mitocondria este o structură delimitată de membrană, situată în citoplasma celulelor eucariote . Este locul fosforilării oxidative și al producerii unor cantități relativ mari de ATP.
   (e) Centriolul este o structură citoplasmatică implicată (prin formarea fibrelor fusului de nucleotidă) în migrarea *cromozomilor* în timpul mitozei și meiozei, în principal în celulele animale .
   (f) Centromerul servește ca punct de atașare pentru cromatidele surori și ca regiune în care fibrele fusului de diviziune se atașează la cromozomi (kinetocor). *Centromerul se divide în timpul* mitozei și meiozei II, ajutând astfel la divizarea materialului cromozomial între celulele fiice .
4. Lungimea totală și poziția centromerului sunt doar doi dintre factorii necesari pentru omologie. Cel mai important , conținutul genetic al cromozomilor nu

Cromozomii omologi tind să fie destul de diferiți. Există și alți factori care pot varia între cromozomii neomologi , inclusiv modelul de bandare și timpul de replicare în timpul fazei S.

6. Metacentric (a), submetacentric (b), acrocentric (c), lelocentric (d).



8. Principalele diviziuni ale ciclului celular includ interfaza și mitoza. Interfaza constă în patru faze: G1, G0, S și G2. În timpul fazei S, ADN-ul cromozomial este duplicat. Consultați figurile din text pentru o diagramă a mitozei. Rețineți că, spre deosebire de meioză, nu există împerecherea cromozomilor omologi în mitoză, iar numărul de cromozomi nu se modifică.

10. (a) *Sinapsa* este împerecherea punct cu punct a cromozomilor omologi în timpul profaza meiozei I.
    (b) *Bivalenții* sunt structuri formate prin sinapsa cromozomilor omologi. Cu alte cuvinte, fiecare bivalent este alcătuit din doi cromozomi (și patru cromatide).
    (c) Termenul *chiasmă* se referă la structura cromatidelor împletite, private microscopic.
    (d) Încrucișarea este schimbul de material genetic între cromatide. Este o metodă de asigurare a variației genetice prin ruperea și reunirea cromatidelor .
    (e) Cromomerii sunt *benzi* de cromatină cu aspect diferențiat față de segmentele învecinate situate de-a lungul unui cromozom.
    (f) *Cromatidele surori* sunt structuri „post-faza S" ale cromozomilor replicați. Cromatidele surori sunt genetic identice (cu excepția cazurilor în care au avut loc mutații) și sunt inițial conectate la același centromer.
    (g) Tetradele sunt cromozomi omologi care au suferit *sinapse* și, prin urmare, sunt compuși din patru cromatide.
    (h) Diadele sunt *compuse* din două cromatide unite printr -un centromer.
    (i) În anafaza II a meiozei, centromerii se divid , iar cromatidele surori *(monadele)* se deplasează spre polii opuși.

12. În timpul meiozei I, numărul de cromozomi este redus la complemente haploide. Acest lucru se realizează prin sinapsa cromozomilor omologi și separarea lor ulterioară. Se pare că ar fi mai dificil din punct de vedere mecanic pentru celulele fiice identice genetic să se formeze în mitoză dacă cromozomii omologi s-ar împerechea. Deoarece cromozomii sunt nepereche în metafaza mitozei, este necesară o singură diviziune centromerică pentru ca celulele fiice să primească complemente cromozomiale identice.

14. În primul rând, prin asortimentul independent de cromozomi în timpul anafazei I a meiozei, celulele fiice (spermatocitele secundare și ovocitele secundare) pot conține seturi diferite de cromozomi derivați de la mamă și tată. În al doilea rând , încrucișarea , care apare mult mai frecvent în celulele meiotice decât în celulele mitotice , permite cromozomilor derivați de la mamă și tată să facă schimb de segmente, crescând astfel - probabilitatea ca celulele fiice (adică spermatocitele secundare și ovocitele secundare) să fie distincte genetic .

16. Ar exista șaisprezece combinații cu adăugarea unei alte perechi de cromozomi.

18. Jumătate din fiecare tetradă va avea un omolog matern: (1/2)°.

20. La angiosperme , meioza are ca rezultat formarea de microspori (masculi) și macrospori (femeli), care dau naștere etapelor haploide de gametofit masculin și feminin . Micro- și macrogametofitele produc polen , respectiv ovule . După fertilizare, se formează sporofitul .

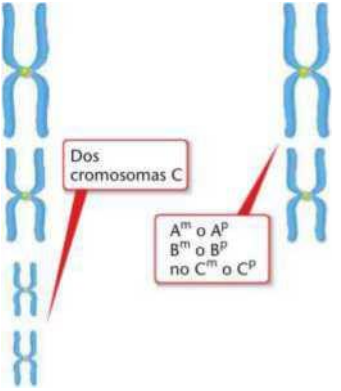
22. Modelul fibrei pliate se bazează pe ideea că fiecare cromatidă este formată dintr -o singură fibră înfășurată ca un ghem de fire. Fiecare fibră este formată din ADN și proteine. Procesul de înfășurare are loc în timpul tranziției de la cromatina în interfază la cromozomi mai condensați în profazele mitozei sau meiozei . Această condensare duce la o contracție de aproximativ 5.000 de ori lungimea ADN -ului din fiecare cromatidă.

24. 50, 50, 50, 100, 200.

26. Cromozomi duplicați A''', A^{p}, B^{m}, B^{p}, C^{m} și C^{p} Acestea se vor alinia în metafază , cu centromerii divizați , iar cromatidele surori mergând la poli opuși în anafază .

28. Atâta timp cât ați numărat opt combinații posibile în problema anterioară , nu va trebui să adăugați nicio combinație nouă în această problemă .

30. Vedeți produsele nedisjuncției cromozomului C la sfârșitul meiozei I după cum urmează.



La sfârșitul meiozei II, presupunând, așa cum indică problema , că cromozomii C se separă ca diade și nu ca monade în meioza II , aș avea

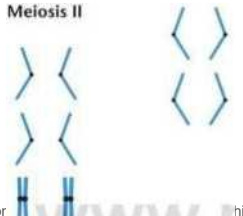
ca posibilitate monade pentru cromozomii A și B și diade (din celula din stânga) pentru ambii cromozomi C.

1
Yo

Genotipurile tuturor indivizilor:

Cruce P!	Descende Carouri	Netez
(a) *PP X PP*	PP	
(b) *PP* X *pp*	pp	
(c) *pp* X *pp*		*PP*
(d) *PP* X *pp*	Pp	
(e) *Pp* X *pp*	pp	*PP*
(f) *Pp* X *Pp*	*pp.pp*	*PP*
(g) *PP* X *Pp*	*pp.pp*	

Meiosis II



32. (a) Numărul de cror hibridului ar fi egal cu suma num speciile parentale: 7 · 4 - 14 = 21.

(b) Întrucât în metafaza I nu are loc nicio împerechere de cromozomi omologi, ne-am putea aștepta la 21 de cromozomi univalenți și la o separare aleatorie „ 1 X 0" a cromozomilor în anafaza I.

Adică, ar exista o separare aleatorie a univalenților către fiecare pol în anafaza I, ceea ce ar duce de obicei la celule haploide neviabile și sterilitate .

Capitolul 3

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

3.1 *P* = în carouri; *p* = simplu.

Cruce (a): *PP* X *PP* sau *PP* X *Pp*

Rețineți la încrucișarea (d) că urmașii în carouri , atunci când sunt încrucișați cu urmași de culoare solidă, produc doar urmași F2 în carouri și rețineți că la încrucișarea (g), atunci când sunt încrucișați cu urmași în carouri, produc în continuare doar urmași în carouri. Cu aceste informații suplimentare, putem concluziona că nu există heterozigoți în urmașii încrucișării (a) și că încrucișarea originală trebuie să fi fost *PP* x *PP*.

Cruce (b): *PP* X *pp*

Încrucișare (c): deoarece toți urmașii acestei încrucișări sunt netezi, nu există nicio îndoială că genotipul ambilor părinți este *pp*.

3.2 Simbolism sugerat:
»v = semințe ridate IV = cotiledoane verzi *G* —
semințe rotunde *g* = cotiledoane galbene

(a) Rețineți că există un raport de 3:1 în ceea ce privește forma semințelor , deci Uiv XW; și nu există cotiledoane verzi, deci *GG* X *GG sau GG* X *Gg*. Combinând cele două caracteristici, obținem

IVivGG X *WwGG*

fie

WwGG X VVwGg

(b) *wwGg* X *WwGg*
(c) *WwGg* X
(d) *WwGgXwwgg*

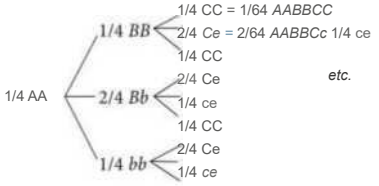
3.3 (a) *Descendenți*

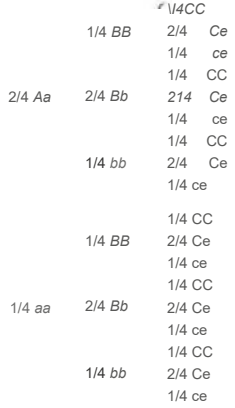
Genotipuri	Proporție	Fenotipuri
AABBCC	(1/16)	
AABBCc	(1/16)	
AABbCC	(1/16)	
AABbCc	(1/16)	
AaBBCC	(2/16)	► *ABC-* - 12/16
AaBBCc	(2/16)	
AaBbCC	(2/16)	
AaBbCc	**(2/16) J**	
aaBBCC	(1/16)	
aaBBCc	(1/16)	
aaBbCC	(1/16)	(wB-C. = 4/16
aaBbCc	(1/16) J	

(b) *Descendent*

Genotipuri	Proporție	Fenotipuri
AaBBCC	1/8	A. *BBC.* = 3/8
AaBBCc	2/81/81/82/8	
AaBBcc	1/8	*A.BBcc* = 1/8
aaBBCC		*aaBBC.* = 3/8
aaBBCc		
aaBBcc		*aaBBcc* = 3/8

(c) Vor exista opt (2^n) tipuri diferite de gameți de la fiecare dintre părinți și, prin urmare, un pătrat Punnett de 64 de pătrate. Rezolvarea acestei probleme folosind metoda diagramei de ramificare ajută foarte mult.





Pur și simplu înmulțiți fiecare componentă pentru a obține frecvențele genotipice finale.

Pentru frecvențele fenotipice, formulați problema după cum urmează:

3/4 C_ = 27/64 A_B_C_
1/4 ce = 9/64 *A_B_cc*

3/4 A--1/4 *bb*^-3/4 C_ efe.
1/4 *CE* LA

1/4 aa—3/4 3/4C_
1/4 CE

1/4 *bb*^—3/4 C_
1/4 CE

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. (a) P>:
Fenotipuri: Negru X Alb
Genotipuri: www.
Fi W (Negru)
Fi XF,:
Fenotipuri:
Genotipuri: Negru X Negru
Război Mondial
F a :
Fenotipuri:
Genotipuri: alb Negru Negru Negru Alb
X W Ww Wiv *ww* alb

(b)
Tot alb

4. Factori unitari în perechi, dominanță și recesivitate, congregație.

6. *Pisam sativum* este ușor de cultivat. Se autopolenizează natural , dar poate avea polenizare încrucișată. Are mai multe caracteristici vizibile (de exemplu, înălțime sau lungime, flori roșii sau albe) care sunt consistente într-o varietate de condiții de mediu, dar contrastează datorită factorilor genetici . Semințele sunt ușor disponibile în magazinele locale.

8. *WWgg* = 1/16

10. 1. Factorii sunt dați în perechi.
2. Unele gene au alele dominante și recesive.
3. Alelele se separă unele de altele în timpul formării gameților. Când cromozomii omologi se separă în anafaza I, alelele vor merge la polii opuși ai aparatului meiotic .
4. O pereche de gene se segregă independent de alte perechi de gene. Diferite perechi de gene de pe aceeași pereche de cromozomi omologi (dacă sunt departe unul de celălalt) sau de pe cromozomi neomologi se vor segrega independent de orice alte perechi în timpul meiozei.

12. Două caracteristici sunt prezentate aici: culoarea corpului și lungimea aripilor . Mai întâi, atribuim simboluri semnificative genelor .

Culoarea corpului	*Lungimea aripii*
E = culoarea corpului gri	V = aripi alungite
e = culoarea corpului abanos	v = aripi vestigiale

(a) P,:

EEVV X *eevv*

F,: *EeVv* (gri, alungit)

F2 : va fi rezultatul unui pătrat Punnett cu 16 pătrate.

Fenotipuri	*Proporție*	*Genotipuri*	*Proporție*
gri, alungit	16 septembrie	*EEVV*	1/16
		EEVv	2/16
		EEVV	2/16
		EEVV	16 aprilie
gri, vestigial	3/16	*EEvv*	1/16
		Eevv	2/16
abanos, alungit	3/16	*eeVV*	1/16
		eeVv	2/16
abanos, vestigial	1/16	*eevv*	1/16

(b) *P,:EEwXeeVV*

F: Este important de menționat că rezultatele acestei încrucișări vor fi exact aceleași ca în secțiunea (a) de mai sus . Singura diferență este că genele recesive provin de la ambii părinți, în loc de la unul singur , ca în (a). Raportul din F2 va fi, de asemenea, același ca în (a). Când avem gene pe autozomi (nelegate de X), segregare independentă, dominanță completă și nicio interacțiune între gene (vezi mai jos) într-o încrucișare care implică indivizi dublu heterozigoți, raportul la urmași va fi 9:3:3:1.

(c) *EEVV X EEvv*

F]: *EEVv* (gri, alungit)

F2 : Reținești că toți urmașii vor avea corpuri gri și că vom obține un raport de 3:1 între aripile alungite și cele vestigiale. Acest lucru trebuie luat în considerare chiar înainte de a începe să lucrăm la problemă. Deși această încrucișare implică două perechi de gene, ne va oferi un raport „monohibrid" deoarece una dintre perechile de gene este homozigotă (culoarea corpului), iar cealaltă pereche este heterozigotă (lungimea aripii).

Fenotipuri gri, alungite

	Proporción	*Genotipos*	*Proporción*
gri, vestigial 14.	3/4	*EEVV EEVv*	1/4 2/4 1/4
Fenotipuri		*EEvv*	
P,: Galben X verde	1/4		
F,: tot galben			
F 2 :6022 galben 2001 verde		*Genotipos GG X gg G** 1/4 GG; 2/4 *Gg*	

GG X GG — toate GG

Gg X *Gg* = 1/4 GG; 2/4 Gg; 1/4 *gg*

16. *Forma semințelor* W = rotunjită *w* — ridată

P (: *WWggX wwGG*

Color de la semilla G — amarilla *g* = verde

F,: WwGg se intersectează cu *wwgg*

(care este o încrucișare de testare tipică)

Descendenții vor avea raportul tipic 1:1:1:1,

1/4 *WwGg* (rotunjit, galben)

1/4 Wwgg (rotunjit, verde)

1/4 *wwGg* (rugos, galben)

1/4 *wwgg* (rug, verde)

18. (a)

Proporție așteptată	*Observată (sau) Așteptată (e)*	3/4
	882885,75	
1/4	299	295,25

$z^2 = X(o - e)^2/e = 0,064$

Examinând tabelul z_2 cu un grad de libertate (deoarece existau două clase, deci n = 1 sau 1 grad de libertate), am găsit o valoare a probabilității (p) între 0,9 și 0,5.

Prin urmare, am spune că există o „potrivire bună" între valorile observate și cele așteptate .

(b)

Proporția așteptată	*Observat (sau)*	*Așteptat (e)*
3/4	705	696,75
1/4	224	232,25

$Z^2 = 0,39$

Valoarea *p* din tabel pentru 1 grad de libertate rămâne între 0,9 și 0,5; cu toate acestea , valoarea x² este mai mare în (b) , ceea ce indică faptul că abaterile de la valorile așteptate sunt mai mari . Abaterea în fiecare caz poate fi atribuită întâmplării .

20. Utilizarea lui *p* = 0,10 ca valoare „critică" pentru respingerea sau încetarea respingerii ipotezei nule, în loc să se utilizeze *p* — 0,05 ar permite respingerea mai multor ipoteze nule. Pe măsură ce valoarea p critică crește , este necesară o valoare p de ² % . Pragul pentru respingerea ipotezei nule este mai mic . Aceasta înseamnă că este necesară o - diferență mai mică între valorile așteptate și cele observate pentru a respinge ipoteza nulă; prin urmare, cerințele pentru a nu respinge ipoteza nulă devin mai stricte .

22. (a) Există două posibilități. Fie trăsătura este dominantă, caz în care 1-1 este heterozigotă, precum 11-2 și 11-3, fie trăsătura este recesivă, caz în care I- 1 este homozigotă, iar 1-2 este heterozigotă. În condiții recesive , atât II-1 , cât și II-4 ar fi heterozigote; II-2 și II-3 sunt - homozigote.

(b) recesiv: părinții *Aa, Aa*

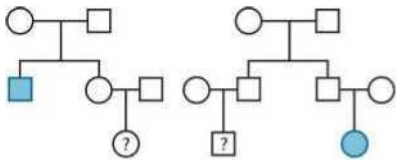
(c) recesiv: părinții *Aa, Aa*

(d) recesiv sau dominant, nelegat de sex; dacă este recesiv , părinții *Aa, aa*

24. *p* = (8! (3/4)'(1/4) ²)/6!2!

26. Cel mai probabil , medicul care i-a tratat pe părinți a diagnosticat greșit sindromul primului copil , spunându-le părinților că malformațiile congenitale nu erau genetice. Având în vedere că al doilea copil s-a născut cu sindromul Smith- Lemli -Opitz, este foarte probabil ca ambii părinți să fie purtători ai unei gene mutante recesive care provoacă acest sindrom. În aceste circumstanțe, există o probabilitate de 25 % ca fiecare copil să fie afectat. Probabilitatea ca doi copii ai părinților heterozigoți să fie afectați ar fi de 0,25 x 0,25 = 0,0625, adică puțin peste 6 %.

28. (a) Prima sarcină este de a întocmi o genealogie exactă (una dintre mai multe posibilități):



(b) 1/3 × 1/4 = 1/12

(c) Probabilitatea ca niciunul să nu fie heterozigot este: 2/3 X 3/4 = 6/12

(d) Probabilitatea de a fi heterozigot este :

(1/3 × 3/4) + (2/3 × 1/4) = 5/12

În mod similar, există doar trei posibilități: ambele sunt heterozigote , niciuna nu este heterozigotă și cel puțin una este heterozigotă. Am calculat deja primele două probabilități, deci ultima este pur și simplu 1 - (1/12 + 6/12) = 5/12.

30. (a) alas rectas = w' alas curvadas = w

quêtas cortas = quêtas largas = *b*

(b) Cruce 1: M'*/w; *b*/b* X *w'lw.b'lb*

Cruce 2: *w'/w, b/b* X *w'lw. b/b*

Cruce 3: *w/w, b/b* X *w'lw; b'lb*

Cruce 4: H'*/«''; *b*/b* X *w'lw'-.b'lb*
(un padre podría ser *w[d]/w)*

Cruce 5: *w/w; b lb* X *w /w, o lb*

32. (a) Conjunto I, valores esperados:

Înalt = 26,25 Pitic = 8,75

Setul II, valori așteptate :

Înalt = 262,5 Pitic = 87,5

Pentru mulțimea I, valoarea lui yj ar fi:

$(30 - 26,25)^2/26,25 + (5 - 8,75)^2/8,75 = 2,15$

cu *p* între 0,2 și 0,05

Prin urmare , am accepta ipoteza nulă conform căreia nu există o diferență semnificativă între valorile așteptate și cele observate .

Pentru setul II, valoarea ar fi :

21,43 și p <0,001

și am respinge ipoteza nulă, presupunând că există o diferență semnificativă între valorile așteptate și cele observate .

(b) În majoritatea cazurilor , gradul de încredere crește pe măsură ce dimensiunea eșantionului crește ; cu toate acestea , în funcție de organism sau experiment , există limite practice ale dimensiunii eșantionului .

34. Deoarece dentinogeneza imperfectă se moștenește ca alelă dominantă , iar mama bărbatului avea dinți normali , bărbatul cu șase copii trebuie să fie heterozigot . Prin urmare, probabilitatea ca primul copil să fie de sex masculin cu dentinogeneză imperfectă ar fi egală cu 1/2 (transmiterea alelei) x 1/2 (probabilitatea ca primul copil să fie de sex masculin) = 1/4. Probabilitatea ca trei dintre cei șase copii să aibă boala se determină cel mai bine aplicând următoarea formulă .

»!

n = numărul total de evenimente (șase în acest caz)
s = numărul de apariții ale rezultatului a *(* de trei ori în acest caz)
l = numărul de apariții ale rezultatului *b* (de trei ori în acest caz)
a = probabilitatea de a fi normal în această familie (1/2)
b = probabilitatea de a avea boala în această familie (1/2)

$p_{r33} =$ -------- $1/2^3\ 1/2^3$

Probabilitatea generală (p) ar fi 5/16 sau aproximativ 0,31 (31%).

Capitolul 4

(a) Padres = sepia X crema

Cruce: X

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

4.1

(b)

2/4 sepie; 1/4 smântână; 1/4 albino

Părinți = sepia x cremă

(eV X *dd** sau *dd** X *dd*)* compusul-părinte al cremei ar putea fi *dWotdd.*

Cruci: c*c“ X $c^{4\ ^\wedge\ 4}$

1/2 sepie; 1/2 smântână*

*(presupunând că părinții sunt homozigoți) oc*c* X *idd* [1] CZH

1/2 sepie; 1/4 smântână; 1/4 albino

(c) Părinți = cremă sepia X

Întrucât cobaiul sepia avea doi părinți de culoare normală , aceștia ar putea fi

C?, Ce^4 sau Ce"

(nu CC deoarece sepia nu putea fi produsă), genotipul său ar putea fi

c*¿ sau

La fel cum porcușorul de Guineea cremos avea doi părinți, sepia.

(?? X c^c [4] sau *d(d* X *dd*)* crema-tată ar putea fi cVoA*.

Cruci:

[c] * c *

c*c* X *eded* «=> toate sepia

d(d X $c^4\ c^4$ <=> 1/2 sepia; 1/2 cremă

d<d X $d^{l}\ d \cdot$ *t*=> 1/2 sepie; 1/2 smântână

dd [1] X $c^{d}\ d^{l}$ '=Z> 1/2 sepie; 1/2 smântână

d(d X $c^{d}\ d^{l}$ => 1/2 sepia; 1/4 cremă; 1/4 albino

(d) Părinți = sepia x cremă

tatăl sepia avea un tată de culoare normală și un tată albino

(Ce* X *d'd),* trebuie să fie c* *d 1.* [Tatăl] crem avea doi părinți de culoare normală care ar putea fi Ce^4 sau Cc“; prin urmare , ar putea fi *(d(d* sau *(dd.*

Cruci:

dd X *d(d^*=> 1/2 sepia; 1/2 cremă

dd X $c^4\ c' \cdot$ => 1/2 sepia; 1/4 cremă; 1/4 albino

4.2 A = pigment, *a* = fără pigment (incolor), B = violet, *b* = roșu.

AaBb X *AaBb*

A _*B*_ = violet *A_bb* = roșu *aaB_* — incolor *aabb* = fără culoare

4.3 Pentru cele trei genealogii, reprezentăm gena mutantă prin a *și* alela sa normală prin A.

(a) Acest pedigree este în concordanță cu o trăsătură recesivă legată de X , deoarece masculul ar contribui cu un cromozom X care transmite mutația *a* fiicei aa . Mama ar trebui să fie heterozigotă *Aa.*

(b) Acest pedigree este în concordanță cu o trăsătură recesivă legată de X , deoarece mama ar putea fi *Aa* și să transmită o alelă *primului* ei copil (a/Y) și alela ei A celuilalt copil.

(c) Această genealogie nu este în concordanță cu un model de moștenire recesivă legată de X , deoarece mama *aa* are un fiu A/Y.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Privind raportul 1:2: 1 la urmașii

mătăsos X mătăsos

ca mod de moștenire este confirmată .

Simbolism:

AA = roșu *aa* = alb

Aa = mărunțiș

AA X AA => *AA aa X aa* = > *aa AA X aa '* = > *Aa* Aa

1/4 AA; 2/4 *Aa-, 1/4 aa*

2/4 *pp* (platină)

1/4 *pp* (argint)

Prin urmare, proporția vulpilor supraviețuitoare este de 2/3 platină , 1/3 argint. Alela P se comportă ca recesivă în ceea ce privește letalitatea (observată doar la homozigot), dar ca dominantă în ceea ce privește culoarea blănii (așa cum se observă la heterozigot).

6. *Grupa sanguină (fenotipul)* *Genotip(uri)*

LA *ri*. i*i*

B. *fi*

AB *tf*

0 *11*

F și I8 *sunt* codominante (rețineți grupa sanguină AB), fiind dominante față

4. PpXPpt^

1/4 PP (letal)

de *i.*

8. Singura *grupă sanguină* care ar dovedi că un bărbat nu este tatăl ar fi AB, deoarece nu există nicio *alele i.* Întrucât mulți indivizi dintr-o populație ar putea avea genotipuri cu alela *i* , nu este posibil să se demonstreze că un anumit bărbat este tatăl folosind această metodă.

10. Cea mai simplă explicație este că combinația homozigotă a trăsăturii *de târâtoare* este letală.

12. Avem de-a face cu trei caracteristici care se transmit independent: culoarea florii (dominanță incompletă), forma florii (dominantă/recesivă) și înălțimea plantei (dominantă /recesivă).

Stabilim simboluri adecvate pentru gene:

Culoarea florii:

RR = roșu, *Rr* = roz, rr - alb

Forma florii

P = persoană, *p* = peliculă

Înălțimea plantei:

D = înalt, *d* = pitic

RRPPDD X rrppdd □=

RrPpDd (roz, personificat, înalt)

Folosiți *componentele* metodei diagramei ramificate după cum urmează:

2/4 roz x 3/4 personaj x 3/4 înălțime = 18/64

14. (a) Acesta este un caz de dominanță incompletă în care, așa cum se arată în a treia încrucișare, heterozigotul (palo mino) dă naștere unui raport tipic de 1:2:1.

= castan

CC = cremello

C h C = palomino

(b) Caii Fj rezultați din încrucișările dintre caii cremello și cei castani ar fi de așteptat să fie în întregime palomino. La F, ar fi de așteptat un raport de 1:2:1 , ca în a treia încrucișare din secțiunea (a) de mai sus.

16. (a) La o răscruce de drumuri

AACC X *aacc*

Descendenții vor fi toți *AaCc* (agouti), deoarece alela C permite depunerea pigmentului în păr, iar când se întâmplă acest lucru, culoarea va fi agouti .

Descendenții F2 vor avea următoarele genotipuri „simplificate", cu fenotipurile corespunzătoare:

A_C_ = 9/16 (agouti)

A_cc = 3/16 (fără culoare deoarece *cc* este epistatic pe A) *aaC_* = 3/16 (negru)

aacc = 1/16 (fără culoare deoarece *cc* este epistatic față de *aa)*

Cele două clase incolore nu sunt fenotipic distincte, așa că raportul final va fi 9:3:4.

(b) Rezultatele încrucișărilor dintre femele agouti

(A_C_) X *aacc* (masculi)

Acestea apar în trei grupuri:

1. Pentru a produce un număr egal de urmași agouti și incolori , părintele matern trebuie să fi fost AACc, astfel încât jumătate dintre urmași să poată depune pigment datorită C; când o vor face, toți vor fi agouti (deoarece au primit doar A de la părintele matern).
2. Pentru a produce un număr egal de urmași agouti și negri , mama trebuie să fi fost Aa , iar din moment ce nu s-au produs urmași incolori , mama trebuie să fi fost CC. Fenotipul ei trebuie să fi fost AaCC .
3. Rețineți că jumătate dintre urmași sunt incolori ; prin urmare , femela trebuie să fi fost Ce . Jumătate dintre urmașii pigmentați sunt negri , iar cealaltă jumătate sunt agouti; prin urmare , femela trebuie să fi fost *Aa.* Per total , genotipul *AaCc* pare adecvat .

Proporția finală ar fi:

3/8 (gri)
1/8 (galben)
4/8 (albinos)

18. (a) Întrucât acesta este un raport de 9:3:3: 1 fără fenotipuri albinoși , părinții trebuie să fi fost dublu heterozigoți și incapabili să producă genotipul ec .

Genotipuri

AaBbCC X *AaBbCC*

fie

AaBbCC X *AaBbCc*

Fenotipuri:

gri X gri

(b) Deoarece nu există urmași de culoare , nu există combinații la părinți care pot produce *aa.* Raportul 4/16 indică faptul că locusul C este heterozigot la ambii părinți.

Dacă părinții sunt:

AABbCc X *AaBbCc*

fie

AABbCc X *AABbCc*

atunci rezultatele ar urma modelul indicat .

Fenotipuri: gri X gri

(c) Rețineți că 16/64 sau 1/4 dintre urmași sunt albinoși; prin urmare , ambii părinți sunt heterozigoți la locusul C. În al doilea rând, rețineți că, fără a lua în considerare locusul *C,* există un raport de 27:9:9:3 , care se reduce la 9:3:3:1 .

Cu aceste informații, fenotipurile ar trebui să fie

AABbCc X *AaBbCc*

Fenotipuri: gri X gri

(d) Genotipuri

aaBbCc X *aabbCc*

Fenotipuri: negru X cremă

(e) Genotipuri

aaBbCc X *aaBbcc*

Fenotipuri: negru X albino

20. Traversarea inițială trebuie să fi fost

AABB X *aabb*

Sunt implicate două perechi de gene .

(a) *A_B_* = 9/16 (mare)

A_bb = 3/16 (pitic)

*aaB_* = 3/16 (pitic)

aabb = *1/16* (pitic)

(b) Există trei clase diferite de plante pitice. În cadrul fiecăreia dintre clasele cu raportul 3/16, există două tipuri :

A_bb = 3/16 (pitic) = 1/3 *AAbb* și 2/3 *Aabb*

și

*aaB_* = 3/16 (pitic) = 1/3 *aaBB* și 2/3 *aaBb*

Prin urmare , plantele pitice de rasă pură ar fi următoarele :

AAbb, aaBB și *aabb*

și ar constitui 3/7 din grupul piticilor .

22. Trecerea 1 = (c)

Trecerea 2 = (d)

Trecerea 3 = (b)

Trecerea 4 = (e)

Trecerea 5 = (a)

24. Perechea este *X^X^; fi* X *X* [G] Y; fi*

Produsul final al probabilităților independente este:

1/2 x 1 x 1/4 = 1/8

26. Presupunând că părinții sunt homozigoți , încrucișările sunt următoarele. Rețineți că simbolul X poate rămâne pentru *a* ne reaminti că gena sd Este situat pe cromozomul X. Este extrem de important să luăm în considerare atât genele mutante , cât și fiecare dintre cele trei alele sălbatice ale acestora .

P^XV/eXXMe/e

F,:

1/2 X [+] X* [d] ;e [+] /e (femeie, normal)

1/2 *X [id] /Y-, e [+] le* (mascul, *festonat)*

Ff

Fenotipuri:

3/16 femele normale
3/16 bărbați normali
1/16 femele *de abanos*
de abanos 1/16
3/16 femele *festonate*
3/16 masculi *scobiți*
1/16 , *festonate*
Masculi de abanos 1/16 , festonați

Metoda de ramificare online:

p.: *XW; e ʳ/e~*
X *X'/Y;e/e* n

F,: 1/2 X*X"; *e* 7e (feminin, normal)
1/2 *X^/Y; e ᶠ* *te* (macho, *festonat)*

Ff

	La	Culoare	
1/4	femele, — normal --------	-3/4 normal ---------- *-1/4 abanos*---------	3/16 1/16
1/4	femele, —■ *festonat* •—	-3/4 normal - 1/4 *abanos* -------	3/16 1/16
1/4	macho,-------- normal --------	-3/4 normal- -1/4 *abanos* - --------	3/16 1/16
1/4	macho,-------- *festonat*	■3/4 normal--------- -1/4 *abanos* —— .	3/16 1/16

28. (a) *P¿XX>,+/+ XX*/Y,b'/b'c=^*

F,: 1/2 X ⁺ X*'; 471/ (femelă, normală) 1/2 *X/Y-, +lb ʳ* (mascul, *vermilion)*

F2 : 3/16 = femele , normale
1/16 = femele, ochi *căprui ;* 3/16 = femele, ochi *vermilion ;*
1/16 = femele, ochi albi; 3/16 = masculi, normali
1/16 = masculi, ochi *căprui* 3/16 = masculi, ochi *vermilion*

Pi:X ⁺ X-,b ʳ /b'XX'/Y-,* **4-/4-**

Fp 1/2 X ⁺ X'; 4- */b ʳ* (feminin, normal) 1/2 X ⁺ /K; *+/b ʳ* (masculin, normal)

F ₂ :6/16 = femele, normale 2/16 = femele, ochi *căprui* 3/16 = masculi,
1/16 = machos, ojos blancos
(b)normali
1/16 = masculi, ochi albi PpXX; *b'/b'XX*/Y;* 47+

Fp 1/2 X ⁺ X'; 4-/6 ʳ (femelă, normală) 1/2 *X/Yi +/b'* (mascul, *vermilion)*

F ₂ : 3/16 = femele, normale 1/16 = femele, ochi *căprui*
3/16 = femele, *ochi vermilion*
1/16 = machos, ojos *brown* 3/16 =
machos, ojos *vermilion*

(c)
1/16 = femele, ochi albi
3/16 = bărbați, normali
1/16 = bărbați, ochi *căprui*
3/16 = masculi, ochi *vermilion* 1/16 = masculi, ochi albi

30. (a, b) Prin urmare, condiția este *recesivă*. În a doua încrucișare, observați că tatăl nu este umbrit, deși fiica (II-4) este. Dacă afecțiunea este recesivă, atunci trebuie să fie și *autosomală*.

(c) II- 1 = *AA sau Aa*
II-6 = *AA* sau *Aa*
II-9 = *Aa*

32. Pp femelă: *HH* X mascul: *hh* Fp toți cu penaj de găină F ₂ : *1/2*
femele
1/4 pene de pui *HH*
2/4 penaj de pui *HH*
1/4 pene de pui *HH*

Toți urmașii ar avea penaj de găină, cu excepția a 1/8, care ar fi masculi cu penaj de cocoș .

34. Expresia fenotipică depinde de genomul organismului , de mediul molecular și celular imediat al genomului și de numeroasele interacțiuni dintre genom, organism și mediu.

36. (a) *AAB_* X *aaBB* (există și alte configurații posibile, dar fiecare dintre ele trebuie să dea toți urmașii cu alelele dominante A și B).
(b) *AaB_* X *aaBB* (sunt posibile și alte configurații, dar nu *se pot produce genotipuri bb).*
(c) *AABb* X *aaBb*
(d) *AABB* x *aabb*
(e) *AaBb* X *Abb*
(f) *AaBb* X *abb*
(g) *aaBb* X *aaBb*
(h) *AaBb* X *AaBb*

1/2 machos plumaje de gallina plumaje de gallina plumaje de gallo

Genotipurile de rasă pură vor fi următoarele:
negru = *AABB*
auriu = toate genotipurile care sunt *bb* maro = *aaBB*

38. Tipul dominant omucid este letal. Tipul fără coarne este cauzat de o alelă dominantă care se transmite independent , în timp ce tipul cu coarne este cauzat de alela recesivă față de tipul fără coarne.

40. Având în vedere gradul de încrucișare, faptul că gena este destul de rară și, prin urmare , heterozigoții sunt mai puțin frecventi și frecvența de transmitere este mare, este probabil ca această formă de pubertate precoce la bărbați să fie cauzată de o genă autozomal dominantă limitată la sex .

42. Având în vedere următoarele genotipuri parentale:
aabb = purpuriu
AABB = alb

F va avea genotipuri *AaBb* cu fenotipuri roz.

În Fj, următoarele genotipuri corespund fenotipurilor date:

*AAB_* = alb 4/16
AaBB = magenta 2/16 *AaBb* = roz 4/16 *Aabb* = portocaliu 2/16
aaBB = galben 1/16 *aaBb* = galben pal 2/16 *aabb* = cărămiziu 1/16

Există o interacțiune între gene, combinată cu absența dominanței complete.

44. Beatriz, Alicia de Hesse și Alicia de Athlone sunt purtătoare. Există o probabilitate de 1/2 ca Prințesa Irene să fie purtătoare.

Capitolul 5

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

5.1 (a) 1/4 *AaBb*
1/4 *Aabb*
1/4 *aaBb*
1/4 *aabb*
(b) 1/4 *AaBb*
1/4 *Aabb*
1/4 *aaBb*
1/4 *aabb*
(c) 1/2 *AB/ab*
1/2 *ab/ab*

În această condiție, A și *B* sunt *cuplate.* Totuși, dacă *A* și *B* Ele nu sunt cuplate, deci simbolismul ar fi *Ab/ aB x ab/ab.*
Descendenții ar fi următorii:
1/2 *AB/ab*
1/2 *aB/ab*

5.2 Adunând procentele de încrucișare (6,9 + 7,1) obținem 14 %, care ar fi distanța pe hartă dintre cele două gene.

5.3. (a, b) + *b dă* + +

(c) Fenotipurile lipsă ale urmașilor sunt ++ *c* și *ab* +, care, pentru 1000 de urmași, ar fi de așteptat.
1,4 (0,7 X 0,02 X 1000). Poate că nu au fost observate din cauza întâmplării sau a unui alt factor selectiv necunoscut.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Importanța biologică a recombinării și a schimbului genetic pare să rezide în generarea de variații genetice în gameți , ceea ce duce la variații

$$\frac{32 + 38 + 0 + 0}{1.000} \text{ X } 100 = 7 \text{ unidades de mapa}$$

$$\frac{11 + 9 + 0 + 0}{1.000} \text{ X } 100 = 2 \text{ unidades de mapa}$$

genetice în organisme. Prin amestecarea genelor, se obțin noi combinații, care pot reprezenta un avantaj evolutiv . În plus, deoarece poziția cromozomială poate influența funcția genelor , variația se obține și prin *efectul de poziție.*

4. Cu unele nuanțe, în special în jurul centromerilor și telomerilor, putem spune că încrucișarea este distribuită mai mult sau mai puțin aleatoriu pe întreaga lungime a cromozomului. Două loci care sunt departe unul de celălalt au o probabilitate mai mare de încrucișare între ele decât două loci care sunt aproape unul de celălalt.

6. Dacă probabilitatea unui eveniment este

$$1/X$$

atunci probabilitatea ca două evenimente să se producă în același timp va fi

$$1/X^2$$

8. Fiecare încrucișare poate fi concepută pentru a dezvălui încrucișările, deoarece hărțile genetice sunt generate pe baza frecvenței încrucișărilor . Heterogenitatea genetică este necesară pentru a putea distinge - diferitele aranjamente genetice generate de încrucișare. Organismul heterozigot trebuie să fie de sexul la care are loc încrucișarea . Cu alte cuvinte, ar fi inutil să se cartografieze genele la *Drosophila* dacă părintele masculin este heterozigot, deoarece încrucișarea nu este tipică la *Drosophila* masculină . În cele din urmă , încrucișarea trebuie concepută astfel încât fenotipurile urmașilor să le dezvăluie ușor genotipurile. Cel mai bun scenariu este atunci când un organism complet heterozigot este încrucișat cu unul care este complet recesiv pentru genele care sunt cartografiate .

10. Cele mai frecvente fenotipuri la urmași , cele paterne , sunt colorate, verzi (88) și incolore, galbene (92). Aceasta indică faptul că părinții heterozigoți ai încrucișării de testare sunt cuplați.

RY/ry X *ry/ry*

cu cele două gene dominante pe un cromozom și cele două gene recesive pe omolog. Având în vedere că există 20 de urmași prin recombinare din 200, sau 20/200, distanța pe hartă ar fi de 10 unități (20/200 X 100 pentru a o converti în procente) între loci *R* și *Y.*

Rețineți că distribuția fenotipurilor este aceeași (patru clase fenotipice) indiferent de clasele care sunt încrucișate.

Unități de hartă

Numărul așteptat de unități *de* hartă între d și *c* Ar fi 44, între *dy și vg* Ar fi 36 și între *d* și *o valoare adp* de 52. Totuși , deoarece există un maxim teoretic de 50 de unități de hartă între oricare două loci la o intersecție, această distanță ar fi sub valoarea de 52 pe care am determinat-o printr - o simplă scădere.

12.

d	*b*	*P*	vg	c	*adp*
31	48	54	67	75	83

14. (a) P,:

sc sv/sc s V X + + +/Y

Fp

+ + +/*SCSV* X *scs* v/Y

(b) Folosind metoda loll pentru a determina secvența genei, examinați clasele parentale și comparați aranjamentul cu clasele dublu recombinante (mai puțin frecvente).

- 33% (unități de hartă)
= 10% (unități de hartă)

$$SC - \mathbf{V} = \frac{150 + 156 + 10+14}{1.000} \text{ X } 100$$

SC ------ *vs.*

$$\frac{46 + 30 + 10 + 14}{1.000} \text{ X } 100$$

33 10

(c, d) Coeficientul de coincidență = 0,727, ceea ce indică faptul că au existat mai puține recombinări duble decât era de așteptat; prin urmare, este la lucru interferența cromozomială pozitivă .

16. (a) P,: *D* ++/+ + + X + *ep/+ ep*

F,:D + +/+ ep X + ep/+ *ep*

Dichete abanos, roz Dichete, roz abanos
Dichete, abanos roz
Dichete, abanos, roz tip sălbatic

(b) Determinați care genă se află în centru comparând clasele parentale cu clasele dublu recombinante.

F2: D + +/+ *ep*
+ *ep/+ ep D e* +/+ *e p*
4- + p/ + *e p D* + *p/+ep* + e+/+ *ep*
Dep/+ ep
+ + +/+ *e p*

F,:
+ +/+ *pe* **X + pe/ +** *pe*
— 3.0 (unități de hartă)
= 18,5 unități de hartă

18. + *cu/ + cu*

20. Întrucât cromatidele surori sunt identice genetic (cu excepția unor mutații noi și rare), încrucișarea între surori nu crește variabilitatea genetică. Încrucișarea somatică nu ar avea nicio influență asupra urmașilor rezultați.

22. (a) Ar exista $2^n = 8$ clase genotipice și fenotipice și acestea ar apărea în raportul 1:1: 1: 1: 1:1:1:1:1 .

$$\frac{12+13 + 2 + 3}{1.000} \text{ X } 100$$

(b) Ar fi două clase și acestea ar fi administrate într-un raport de 1:1.

$$\frac{84 + 96 + 2 + 3}{1.000} \text{ X } 100$$

(c) Există 20 de unități de hartă între loci A *și B* , iar locusul C ar fi transmis independent de loci *A și B*.

24. Spre deosebire de celelalte organisme menționate, un singur cuplu uman produce relativ puțini urmași, iar numărul haploid de cromozomi este relativ mare (23), astfel încât există un număr destul de mic de gene identificabile per cromozom. În plus, dosarele medicale precise sunt adesea dificil de obținut, iar ciclul de viață este relativ lung.

26. Atribuiți următoarele simboluri, de exemplu:

R — Roșu r = galben
O = Oval *sau* = lung

Descendentul lui A: *Ro/rO* X *rroo* — 10 unități de hartă Descendentul lui B: *RO/ro* x *rroo* — 10 unități de hartă 28. 10 unități de hartă.

30. Pentru traversarea 1 :

X 100 - 50 unități de hartă

Deoarece există 50 de unități de hartă între genele *a și b,* acestea nu sunt legate.

Pentru trecerea 2:

- X 100 = 12 unități de hartă 100

Întrucât genele *a și b* nu sunt legate, ele ar putea fi pe cromozomi diferiți sau la o distanță foarte mare (50 de unități de hartă sau mai mult) pe același cromozom. Întrucât genele *cyb* sunt legate și, prin urmare, se află pe același cromozom, este posibil și ca genele *a și c* să se afle pe perechi de cromozomi diferite. În această situație, NP și P (ditipurile paterne) ar fi aceleași; cu toate acestea, există posibilitatea să apară următorul aranjament și ca genele *a și c* să fie legate.

36 + 14
100

<50 **12**
a— cb

>50

32. (a) Tetrade *problematice* *ale clasei*

1	NP
2	T.
3	P.
4	NP
5	T.
6	P.
7	T.

(b) Dacă P = NP, ele sunt transmise independent . În această problemă, P = 44 și NP = 2. Prin urmare, genele sunt legate .

(c) Distanța centromerului până la *d*\

Acum împărțim la 2, ceea ce ne dă 15,9 unități de hartă.

$$\frac{17\_ + 1 \underline{+ 3} + 1}{69} \textbf{ X 100 = 31,9}$$

Harta ar fi, conform acestor valori:

C ---------- *c* ---------- *d*

fie

c ..... C ....*d*

Dacă cele două gene ar fi situate pe laturi opuse ale centromerului , numărul mai mare de aranjamente tetradice (5 odată) ar fi asociat cu trei evenimente de crossing-over. Deoarece probabilitatea recombinărilor multiple scade pe măsură ce numărul de recombinări crește , pare rezonabil să presupunem că genele sunt situate pe aceeași parte a centromerului .

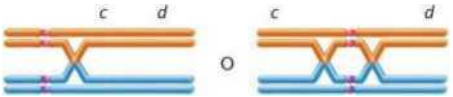
2 + 12 _ 3
= ----- ---- — = 20 unități de hartă

Discrepanța dintre cele două sisteme de cartografiere este cauzată de

(e) C- -* *c* .....- *d*
^9 ÎM

modul în care acestea înregistrează produsele segregării în prima și a doua diviziune. De exemplu , în aranjamentul tetradic 1 există de fapt două încrucișări între gena *d* și centromerul, dar este totuși evaluat ca o segregare în prima diviziune. În aranjamentul tetradic 4, au loc trei încrucișări între gena *d* și centromer, dar acestea sunt evaluate ca unul singur. Dacă s-ar trasa toate încrucișările necesare pentru a produce aranjamentele tetradice care apar în această problemă, ar deveni clar că există multe încrucișări între gena *d* și centromer care nu sunt detectate la evaluarea aranjamentelor genei *d în sine*. Acest lucru duce la o subestimare a distanței și, prin urmare, a discrepanței observate. Am putea lua în considerare aceste clase suplimentare de încrucișare pentru a face harta mai precisă.

(f) Tetradă clasa 6.



34. Căutați o suprapunere între numărul de cromozomi din clonele indicate și genele exprimate. Rețineți că *ENOI* este exprimat în clonele B, D și E; cromozomii 1 și 5 sunt comuni acestor clone. Cu toate acestea, deoarece ENOI nu este exprimat în clona C, căreia *îi lipsește* cromozomul 1 (dar are cromozomul 5), *ENOI* trebuie să fie localizat pe cromozomul 1.

MDH1: cromozomul 2

PEPS: cromozomul 4

PMG1: cromozomul 1

36. La masculi, nu există crossing over, iar dacă cele două gene se află pe același cromozom, va exista o legătură completă a genelor în gameții masculini . La femele , crossing-ul va duce la obținerea atât a gameților paterni, cât și a celor recombinanți. Gameții rezultați vor fi femeli (stânga) și masculi (dreapta):

bw st**	1/4	*bw* st** 1/2
bw st*	1/4	*jumătate de* linie
*bwst**	1/4	
bwst	1/4	

Combinând acest e Pregameții vor fi obținuți în proporția așezați la masa rezultatelor.

38. Calcularea distanței dintre B și *m* Ar fi după cum urmează:

(57 + 64)/ (226 + 218 + 57 + 64) X 100 = = 121/565 X 100 = 21,4 unități de hartă

Am concluziona că locusul *abanosului* este departe de B și *ni* (50 de unități de hartă sau mai mult) sau că este situat pe un cromozom diferit . De fapt, *abanosul* se află pe un cromozom diferit .

40. (a) Datele prezentate în acest tabel arată o corelație inversă între frecvența recombinării și numărul de urmași născuți -vii cu diverse trisomii . Pe măsură ce frecvența crossing-over-ului scade , frecvența trisomiei crește. Deși aceste date indică o corelație, alți factori, cum ar fi supraviețuirea intrauterină, joacă probabil și ei un rol în determinarea frecvențelor trisomiei la nașterile vii .

b) Dacă interferența pozitivă distribuie încrucișarea între și în interiorul cromozomilor , atunci asigurarea faptului că încrucișarea este distribuită între toți cromozomii (și între toate porțiunile cromozomilor) poate reduce non-disjuncția și, prin urmare, poate oferi un avantaj selectiv. Acest model presupune că numărul total de încrucișări per ovocit impune un factor limitator .

Capitolul 6

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

6.1 TCHROMBAK

Toate genele pot fi legate, rezultând o hartă coerentă; în plus, capetele se suprapun, indicând faptul că harta este circulară. Ordinea este inversată la două dintre încrucișări, indicând faptul că direcția transferului de gene a fost inversată.

6.2 Înmulțirea lui 0,031 cu 0,012 produce 0,00037 , sau aproximativ 0,04 % . Pe baza acestor informații , am considera că nu există nicio legătură între aceste două loci. Rețineți că această frecvență este aproximativ aceeași ca în al doilea experiment, unde loci-urile se transformă independent .

6.3 Pentru grupa A, *d* și *f* se găsesc în același grup de complementare (genă), în timp ce *e* Se află într -unul diferit. Prin urmare, *eXf* = liză.

Pentru grupul B, toate cele trei mutații sunt în aceeași genă, prin urmare *b* X *i* = fără liză.

În grupa *C, j* și *k* se află în grupuri de complementare diferite, la fel ca în cazul lui *j.* Ar fi imposibil

de determinat dacă *l* și k se află în același grup de complementare sau într-unul diferit dacă regiunea rii *ar* avea mai mult de doi cistroni. Totuși, deoarece există doar două regiuni de complementare *și* ambele se află într -o regiune diferită a *j,ky l* Trebuie să fie în celălalt.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Conjugarea depinde de factorul F, care, printr -o varietate de mecanisme, poate dirija schimbul genetic dintre două celule bacteriene. Transformarea este încorporarea ADN -ului exogen de către celule. Transducția este schimbul de material genetic utilizând un bacteriofag .

4. (a) Într-o încrucișare F*XF, transferul factorului F produce o bacterie receptoare care este F1 · Orice genă poate fi transferată într- o F', iar frecvența de transfer este relativ scăzută. Încrucișările HfrXF produc recombinare la o frecvență mai mare decât încrucișarea F* XF. Transferul este direcționat (nu aleatoriu) , iar celula receptoare rămâne F.

   (b) Bacteriile care sunt F * posedă factorul F, în timp ce cele care sunt F nu îl au. În celulele Hfr , factorul F este integrat în cromozomul bacterian , iar în bacteriile F' , factorul F este eliberat din cromozomul bacterian , deși acestea posedă încă un fragment din acesta.

6. Bacteriile participante sunt de obicei de două tipuri: prototrofe și auxotrofe. Dacă se utilizează mai întâi un mediu minimal, auxotrofele nu ar putea crește. Transferul într- un mediu minimal permite detectarea bacteriilor recombinante . Bacteriile mutante nu ar fi identificabile dacă bacteriile participante ar fi transferate într- un mediu complet .

8. Elementul F ' se poate integra în cromozomul bacterian gazdă și, la revenirea la starea sa independentă, poate transporta un fragment din cromozomul bacterian. Când intră într - o bacterie cu un cromozom complet , se formează un diploid parțial sau un merozigot .

10. În timpul transformării , ADN -ul primit formează un complex cu cromozomul gazdă, rezultând o dublă spirală care conține o catenă de ADN gazdă și o catenă de ADN primit. Deoarece aceste două catene diferă în secvența lor de baze (altfel , nu ar exista recombinare genetică), termenul de *heteroduplex* pare potrivit. După o rundă de replicare, ADN-ul heteroduplex se rezolvă într-o structură cu dublă spirală identică cu ADN-ul gazdă original și un ADN mutant cu dublă spirală.

12. O *zonă cu chelie* este ceea ce apare atunci când bacteriile dintr-un gazon sunt infectate de un fag, iar urmașii fagilor distrug (lizează) bacteria. Apare o zonă mai deschisă la culoare , care se numește zonă cu chelie.

    Lizogenia este un proces complex în care anumiți fagi atenuați pot pătrunde într-o celulă bacteriană și, în loc să urmeze o cale de dezvoltare litică , își pot integra ADN-ul în cromozomul bacterian. Procedând astfel, celula bacteriană devine lizogenă . Cromozomul fagic latent , *integrat* , se numește *profag*.

14. Gena *c* Este la mijloc . Distanțele de pe hartă sunt următoarele :

    la ac = (740 + 670 + 90 + 1 10)/ 1 0,000 = = 16,1 unități de hartă

    taxi = (160 + 140 + 90 + 110)/10.000 = = 5 unități de hartă

    Se produce o interferență negativă.

16. Pornind de la un singur bacteriofag, un ciclu litic dă naștere la aproximativ 200 de fagi; încă trei cicluri litice ar produce (200) ^{4} sau 1.600.000.000 de fagi.

18. În *E. coli* Atât tulpinile mutante (rZZ), cât și cele de tip sălbatic ale fagului T4 pot crește în B ; cu toate acestea, numai fagii T4 de tip sălbatic pot crește în K12 . Prin urmare , gradul de recombinare dintre diferite tulpini *rii* Acest lucru poate fi determinat prin examinarea numărului de zone cu chelie în K12, deoarece numai tulpinile recombinante de tip sălbatic vor putea crește . În *E. coli* B poate dezvolta un număr mare de fagi T4 .

20. 2(5 X 10*)/(2X 10 ^{5}) = 5 X 10 ^{4}

22. (a) Complementare combinată

1.2	-
1.3	+
2.4	+
4.5	-

24. Deoarece frecvența transformanților dublu transformați este foarte mare (comparați transformanții trp + ^{tyr} ~ din experimentele A și B), putem concluziona că genele sunt strâns legate. Partea B a experimentului ne oferă frecvențele de transformare ale genelor individuale și frecvența transformanților care primesc două fragmente de ADN (2 în tabelul de date). Cunoașterea acestor numere este necesară pentru a estima numărul real de cotransformări *trp* $^+$ *tyr* $^+$.

26. Concentrația suspensiei originale de fagi ar fi:

    10 X IO ^{6} X 17 = 1,7 X 10'

    - formând unități pe mililitru.

28. Deoarece *g* cotransformă cu f Probabil se află în „*grupul de legătură* " cbf și ne-am aștepta să se cotransforme cu fiecare dintre ele. În mod similar, nu ne-am aștepta la o transformare mos cu *a, d.* sau *e*.

30. (a) Nu, nu toate grupele funcționale au același impact asupra transferului conjugativ al lui R27. Regiunile 1, 2 și 4 par a fi cele mai puțin influențate de mutație , deoarece transferul este de 100%.

    (b) Regiunile 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13 și 14 par să aibă cel mai mare impact asupra conjugării , deoarece atunci când sunt mutante, conjugarea nu are loc.

    (c) Regiunile 7 și 11, atunci când sunt mutante, împiedică doar parțial conjugarea; prin urmare, probabil că au un impact mai mic asupra conjugării decât cele enumerate în secțiunea (b).

    (d) Datele obținute în urma acestei probleme oferă informații interesante despre complexitatea proceselor genetice implicate în conjugarea bacteriană. Regiunile care au cel mai mare impact asupra conjugării se încadrează în trei grupuri funcționale diferite. În plus,

reţineţi că regiunile 1, 2, 4, 7 şi 11 , care par să aibă un impact redus sau inexistent asupra conjugării, sunt înrudite funcţional, aşa cum indică colorarea lor .

Capitolul 7

Răspunsuri la secţiunile „Acum rezolvă asta”

7.1 La mamifere, determinarea sexului depinde de prezenţa unui fragment al cromozomului Y. Dacă acesta este prezent, se dezvoltă un mascul . La **Boneilia viridis**, trompa femelei produce o substanţă care declanşează un model de dezvoltare morfologică, fiziologică şi comportamentală, rezultând masculi. Pentru a clarifica mecanismul , s-ar putea încerca izolarea şi caracterizarea substanţei active prin testarea diferitelor fracţiuni chimice ale trompei. În al doilea rând, analiza mutanţilor oferă de obicei informaţii critice asupra proceselor de dezvoltare. În funcţie de caracteristicile organismului, s-ar putea încerca izolarea mutanţilor care duc la modificări în dezvoltarea femelelor sau masculilor. În al treilea rând, folosind microtransplantul de ţesuturi, s-ar putea încerca să se determine care „centre” anatomice ale embrionului răspund la semnalele chimice ale femelei.

7.2 (a) Ceva s -a pierdut în sistemul de determinare plus culina determinării sexului, la nivelul genelor , produselor genice sau receptorilor etc.

(b) Gena *SOX9,* sau produsul acesteia , este probabil implicată în dezvoltarea masculină . Este posibil să fie activată de SRY.

(c) Probabil există o relaţie evolutivă între gena *SOX9* şi *SRY.* Există dovezi considerabile că multe alte gene şi pseudogene sunt, de asemenea, omoloage cu *SRY.*

(d) Dezvoltarea sexuală feminină normală nu necesită gena *SOX9* sau produsele acesteia.

7.3 Dacă presupunem că celula ovariană a fost implicată în inactivarea cromozomului X, celula ovariană pe care Rainbow a donat-o pentru a crea CC conţinea o genă neagră activată şi o *genă portocalie* dezactivată (datorită inactivării cromozomului X). Aceasta înseamnă că, pe măsură ce CC s-a dezvoltat , celulele sale nu au modificat acest model de inactivare. Prin urmare , spre deosebire de Rainbow , CC s-a dezvoltat fără ca nicio celulă să specifice culoarea portocalie a blănii. Rezultatul a fost blana tigrată alb-negru pe care o prezintă CC. Dacă modelul de inactivare ar fi fost inversat, astfel încât ambele alele , cea *neagră* şi *cea portocalie ,* ar fi fost iniţial active şi ulterior dezactivate aleatoriu , CC tot nu ar fi arătat identic cu Rainbow , deoarece modelul de inactivare este aleatoriu , iar distribuţia marcajelor albe este variabilă.

Răspunsuri la probleme şi întrebări pentru discuţii

2. (a) Termenul *heteromorfic* se referă la situaţia în care ambii cromozomi sexuali au aceeaşi formă. Termenul *heteromorfic* se referă la condiţia din multe organisme în care există două forme diferite de cromozomi, cum ar fi X şi Y.

(b) La speciile de izogathne , Există o mică diferenţă vizibilă între celulele haploide care se reproduc asexuat şi gameţii haploizi implicaţi în reproducerea sexuată. Cei doi gameţi care fuzionează în timpul fertilizării sunt indistinguibili din punct de vedere morfologic şi se numesc *izogameţi.* Un organism *heterogam* Este una în care există doi gameţi distinşi din punct de vedere morfologic .

6. Forma *Protenor de determinare* a sexului implică condiţia XX7X0 , în timp ce modul *Lygaeus* implică condiţia XX/XY .

Mamiferele posedă un sistem de inactivare a cromozomului X care permite unuia dintre cei doi cromozomi X la femele să devină un corp de cromatină sexuală, sau corp Barr . Dacă unul dintre cromozomii X este inactivat aleatoriu , cantitatea de informaţii genetice va fi mai mult sau mai puţin echivalentă la masculi (XY) şi femele (XX).

Cromozomul Y determină masculinitatea la oameni , iar o regiune specifică a cromozomului Y este cea care determină această masculinitate; această regiune se numeşte regiunea de determinare a sexului (SRY). SRY codifică un produs numit factor determinant al testiculelor (TDF), care determină formarea testiculelor de către ţesuturile gonadale nediferenţiate. Persoanele cu complementul cromozomului 47 ,XXY sunt bărbaţi, în timp ce cele cu 45,XO sunt femei. La *Drosophila ,* Echilibrul dintre numărul de cromozomi X şi

8. numărul de seturi haploide de autozomi determină sexul. Spre deosebire

12. de specia umană , *Drosophila* XO înseamnă masculin, iar complementul XXY înseamnă feminin.

(a) femelă *X™Y* X — mascul X ⁴ X ⁺

10. F,: femele: — X*Y (normal)
bărbaţi: — r*X* (normal)

F2 . femele: — X'Y (normal) X"*Y (aripi reduse)

bărbaţi: — X ᵣ " X ⁴ (normal) X* X* (normal)

(b) femelă *X* . ʷ *X* ʳʷ X — mascul X ⁺ Y

Femele Fp: — X~ X ⁴ (normal)
bărbaţi: — *X^Y* (aripi reduse)

F2 . femele : — X^X* (normal) X^X™ (aripi reduse)

bărbaţi: — X ⁴ Y (normal) *X* ʳʷ *Y* (aripi reduse)

14. Deoarece cromozomii X cu cromozomi fuzionaţi au un mod de moştenire de la mamă la fiică , iar X - ul tatălui este transferat la fiu, fiicele ar fi observate cu fenotipul cu ochi albi , iar fiii cu fenotipul cu aripi miniaturale .

16. Deoarece sinapsa cromozomială din ţesuturile meiotice este adesea însoţită de crossing over, ar fi dăunător mecanismelor de determinare a sexului să existe loci de determinare

a sexului pe cromozomul Y care ar fi transferați, prin crossing over, pe

Sindrome de Turner (XO) =	0
47,XYY	= 0
47, XXX	= 2
48, XXXX	= 3

cromozomul X.

18. Sindromul Klinefelter (XXY) = 1

20. Dacă nu sunt disponibili alți markeri citologici sau moleculari, ipoteza Lyon nu poate fi testată cu gene homozigote legate de X.

22. Compensarea dozei și formarea corpilor Barr au loc numai atunci când există doi sau mai mulți cromozomi X. Masculii au în mod normal un singur cromozom X, deci un astfel de mozaicism nu poate apărea.

24. În loc de inactivarea cromozomului X, așa cum se observă la oameni (și la mamifere în general), genele masculine legate de cromozomul X din *Drosophila* sunt transcrise cu o rată dublă față de genele comparabile ale cromozomului X din *Drosophila femelă.*

În text au fost ridicate mai multe posibilități . Abaterile semnificative de la raportul 1:1 dintre masculi și femele ar putea fi explicate prin sugestia că, în timpul anafazei I a meiozei, cromozomul Y migrează mai frecvent către polul care produce cele mai viabile celule spermatozoizi. De asemenea, s-ar putea specula că spermatozoizii purtători ai cromozomului Y au o probabilitate mai mare de supraviețuire în tractul reproducător feminin sau că suprafața ovulului este mai receptivă la spermatozoizii purtători ai cromozomului Y. În prezent , mecanismul rămâne neclar.

28. Datorită omologiei dintre genele roșii și verzi, există posibilitatea unor sinapse neregulate, care, după încrucișare, ar duce la un cromozom cu o singură (vezi) dintre gene duplicată.

30. Prezența cromozomului Y oferă un factor (sau factori) care duce la specificarea inițială a masculinității și la formarea testiculelor. Expresia ulterioară a caracteristicilor sexuale secundare trebuie să depindă de interacțiunea alelei normale Tftn legate de X cu testosteronul . Fără o astfel de interacțiune, diferențierea urmează calea feminină. Pentru a testa natura dominantă a alelei Tftn , un bărbat XXY heterozigot pentru alela Tfm ar putea fi degenerat . Dacă ar apărea același fenotip de feminizare testiculară, acest lucru ar susține presupunerea privind natura dominantă a *alelei Tftn. Dacă fenotipul Tftn* ar fi eliminat la individul heterozigot , acest lucru ar susține modelul care afirmă că alela *Tftn normală* este necesară pentru a interacționa cu testosteronul .

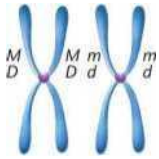
32. La țestoasele chiquiguao, determinarea sexului este puternic influențată de temperatură, masculii fiind favorizați în intervalul 26-34 °C. Șopârlele, pe de altă parte, par să aibă sexul determinat de alți factori decât temperatura, în intervalul 20-40 °C.

34. (a) Următoarele figuri prezintă doar cromozomii relevanți pentru genotipurile *Mm* și *Dd.* În cazul *genotipului MmDd,* ambele diade se separă intacte în spermatocite secundare și sunt potențial capabile să fertilizeze ovulul. (Aici este prezentată o singură configurație a genotipului MmDd .)

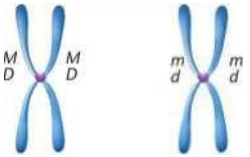
Următoarea imagine prezintă genotipul *MM dd* care duce la fragmentarea cromozomului care conține cromozomul *m.* Astfel, doar cromozomul ma care conține cromozomul *M este disponibil pentru fertilizare.*

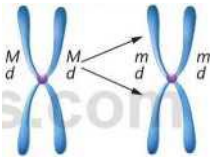
Spermatocit primar

Espermatocito primario

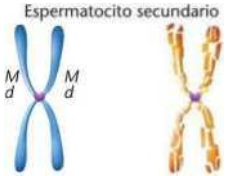


Espermatocito secundario





Espermatocito secundario



(b) Au existat numeroase încercări de a controla speciile de insecte dăunătoare prin prevenirea reproducerii sau fertilității unuia dintre sexe. În acest caz, dacă un factor care distorsionează raportul dintre sexe ar putea fi integrat cu succes într-un grup suficient de mare de masculi, atunci numărul de femele ar putea fi redus . Rămâne de văzut dacă o populație de insecte dăunătoare poate fi gestionată în mod adecvat printr- o astfel de metodă .

36. Celulele sexuale răspund la semnalele transportate în fluidele corporale (neautonome) sau aceste semnale sunt specifice celulelor (autonome)? Testele de transplant reciproc pot fi utilizate pentru a determina influența mediului anatomic asupra diferențierii celulare . Întrucât ginandromorfele mascul/femel pot fi produse de la bun început, acest lucru pledează pentru un mecanism autonom de diferențiere sexuală, spre deosebire de ceea ce observăm la mamifere.

Capitolul 8

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

8.1 Dacă tatăl ar fi avut hemofilie, individul cu sindrom Turner ar fi moștenit probabil cromozomul X al tatălui și niciun cromozom sexual de la mamă. Dacă la mamă s-ar fi produs o nedisjuncție, fie în timpul meiozei I, fie în timpul meiozei II, rezultatul ar fi putut fi un ovul fără cromozomi X.

8.2 Sterilitatea hibrizilor interspecifici este de obicei cauzată de o proporție mare de monovalenți în meioză.

I. Prin urmare, gameții viabili sunt rari, iar probabilitatea întâlnirii a doi astfel de gameți este mică. Chiar dacă omologia parțială a cromozomilor permite o anumită împerechere, sterilitatea este de obicei norma. Cultivatorul poate încerca să inverseze sterilitatea tratând hibridul steril cu colchicină. Dacă are succes, acest tratament poate dubla numărul de cromozomi, iar fiecare cromozom va avea apoi un omolog cu care se va împerechea în timpul meiozei.

8.3 Rarele duble încrucișări în limitele unei inversiuni paracentrice sau pericentrice produc doar abateri minore de la aranjamentul cromozomial standard, cu condiția ca aceste încrucișări să implice aceleași două cromatide. În cazul dublelor încrucișări bicatenare, a doua încrucișare compensează prima. Cu toate acestea, dublele încrucișări tricatenare și cvadruplacatenare au consecințe care duc la formarea de punți anafazice, precum și la un grad ridicat de gameți dezechilibrați genetic.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Cu un număr diploid de 18 (2n), un haploid (n) ar avea 9 cromozomi, un triploid (3n) ar avea 27 de cromozomi, iar un tetraploid (4n) ar avea 36 de cromozomi. Un individ trisomic ar avea un cromozom în plus (19), iar un individ monosomic ar avea cu unul mai puțin decât indivizii diploizi (17).

4. Persoanele cu sindrom Down, deși suferă de defecte congenitale cu predispoziție la boli respiratorii și leucemie, pot trăi bine până la vârsta adultă. Persoanele cu sindrom Patau sau Edwards trăiesc, în medie, mai puțin de patru luni. Comparând diferitele dimensiuni ale cromozomilor implicați (21, 13 și respectiv 18), de exemplu, folosind cifrele furnizate în text, sugerează că, cu cât cromozomul este mai mare, cu atât este mai mică probabilitatea de supraviețuire pe termen lung. În plus, este rezonabil să ne așteptăm ca anumiți cromozomi, datorită conținutului lor genetic, să poată influența dezvoltarea în moduri diferite.

6. Analiza cariotipului fetușilor avortați spontan a arătat că un procent semnificativ de avorturi spontane sunt trisomice și că toți cromozomii pot fi implicați. Alte forme de aneuploidie (monosomie, nulisomie) sunt mai puțin frecvente.

8. Bumbacul cultivat în America are 26 de perechi de cromozomi: 13 mari și 13 mici. Bumbacul din Lumea Veche are 13 perechi de cromozomi mari. Probabil a avut loc o hibridizare interspecifică urmată de duplicarea cromozomilor. Aceste evenimente au produs probabil un amfidiploid fertil (alotetraploid). Au fost efectuate experimente pentru a reconstitui originea bumbacului cultivat în America.

10. Deși se pare că heterozigoții care prezintă o inversiune suprimă crossing-over-ul, fenomenul este amplificat de faptul că cromatidele recombinante ajung să aibă un conținut genetic normal. Prin urmare, fie nu produc gameți viabili (sau competitivi), fie duc la moartea zigotului sau a embrionului.

12. Genele moderne ale globinei sunt rezultatul unui eveniment de duplicație care a avut loc într-o genă ancestrală acum aproximativ 500 de milioane de ani . În timp , au apărut mutații , iar o aberație cromozomială a separat genele duplicate , lăsând în urmă ceea ce avea să devină grupul a *pe* cromozomul 16 și ceea ce avea să devină grupul /> pe cromozomul 11.

14. Când genele sunt inversate, cromatidele recombinante nu se recuperează și, prin urmare, nu sunt transmise generațiilor viitoare. Translocațiile oferă o oportunitate pentru noi combinații de gene prin asocierea genelor din cromozomi neomologi. În anumite circumstanțe, astfel de noi combinații pot avea avantaje selective, iar condițiile meiozei au evoluat în așa fel încât segregarea cromozomilor translocați produce un grup relativ uniform de gameți.

16. Având în vedere complementul cromozomial de bază format din 9 cromozomi diferiți (un complement haploid), alte forme cu „multipli de n” sunt tipuri de autopoliploidie. Organismele individuale cu 27 de cromozomi (3n) sunt mai predispuse la sterilitate deoarece există trivalenți în meioza I, care determină formarea unui număr relativ mare de gameți dezechilibrați.

18. Intersecția ar fi următoarea:

WWVVW X *wwww*
(presupunând că cromozomii se împerechează
ca bivalenți în meioză)

F_B : WWM'W

F 2 : 1WW 1

Primul Război Mondial
Al 4-lea Război Mondial
lww

20. Deși au fost documentate mai multe mecanisme pentru reversia de tip bobbed , unul se bazează pe recombinarea meiotică și are loc prin încrucișare inegală. Atunci când regiunile cromozomiale redundante formează sinapse, omologii se pot alinia greșit . Dacă încrucișarea are loc în segmentele nealiniate, o cromatidă poate câștiga material cromozomial în detrimentul celeilalte. Pe măsură ce un cromozom câștigă gene ARNr, acesta oferă un avantaj selectiv și produce musculițe care sunt mai capabile să concureze decât cele cu mutații *bobbed* care nu au revenit la normal. În cele din urmă ,

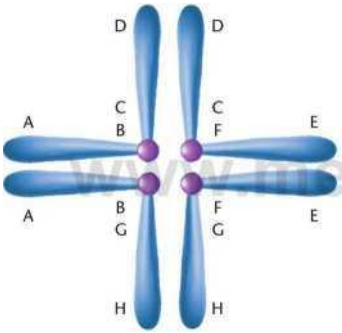
Rellene el cuadro de Punnett 35
fenotipos W y un fenotipo w

un stoc care conținea inițial musculițe *Drosophila* de tip *bobbed* va ajunge să conțină ceea ce par a fi musculițe de tip sălbatic.

22. (a) După toate probabilitățile, încrucișarea pe partea de inversie a unei inversiuni (în starea heterozigotă) a produs cromatide defecte, dezechilibrate, rezultând copii cu malformații și/sau nașteri de copii morți.
    (b) Este probabil ca un procent semnificativ (poate 50%) dintre copiii bărbatului să fie influențați în mod similar de investiție.
    (c) Întrucât anomalia cariotipică este observabilă, este posibil să se detecteze unii dintre cromozomii anormali ai fătului prin amniocenteză sau CVS. Cu toate acestea, în funcție de tipul de inversiune și de capacitatea de a detecta modificări minore ale modelelor de benzi, este posibil să nu fie detectați toți cromozomii anormali.

24. (a) Translocație reciprocă.
    (b)

    (c) Rețineți că toate segmentele cromozomiale sunt prezente și nu există nicio pierdere aparentă de material cromozomial. Cu toate acestea, dacă punctele de ruptură pentru translocație apar în cadrul

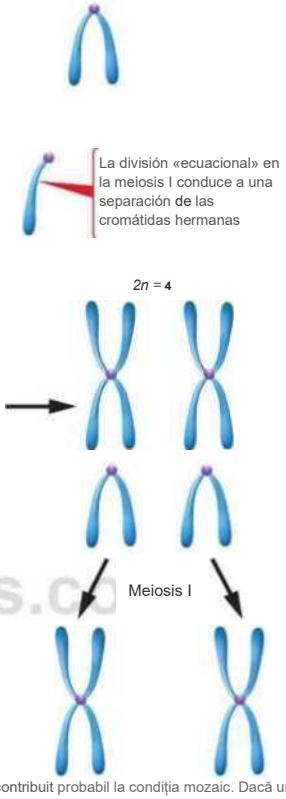


genelor, rezultatul poate fi un fenotip anormal. În plus, funcția unei gene este uneori influențată de poziția sa (cu alte cuvinte, de vecinii săi). Dacă apar astfel de „efecte poziționale", rezultatul poate fi un fenotip distinct.

26. Simbolismul t(14 ;21) indică faptul că a avut loc o translocație (t) între cromozomii 14 și 21. În general, o persoană cu sindrom Down cu cariotip t(14;21) are 46 de cromozomi.

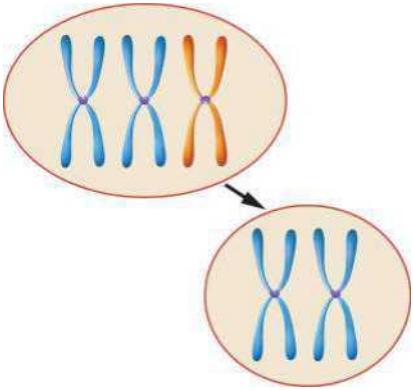
28. Rețineți că în această întrebare, un cromozom este definit ca fiind compus din două cromatide surori unite prin centromer . Aceasta este structura așteptată la sfârșitul meiozei I. (a) Având în vedere aceste informații, meioza I trebuie să fi produs ovocitele anormale cu mai mult sau mai puțin de 24 de cromozomi, indicând condiții multiple de nedisjuncție. Mai probabil, ovocitele sunt compuse din 22 1/2 cromozomi, adică 22 de diade normale și o singură monadă.

    (b) Rezultatul va fi un zigot monosomic și un zigot normal, presupunând că jumătatea de cromozom (monada) migrează intactă către un pol sau altul.
    (c) După toate probabilitățile, diviziunea prematură a centromerului (în meioza I) este cauza unui singur cromozom (neduplicat) în meioza II .
    (d) În general, considerăm că nedisjuncția în timpul meiozei I apare deoarece doi cromozomi intacți (două cromatide surori) nu se separă corect. Aceste date indică faptul că unele forme de aneuploidie rezultă din diviziunea prematură a centromerului în timpul meiozei I, așa cum se arată în figura următoare:

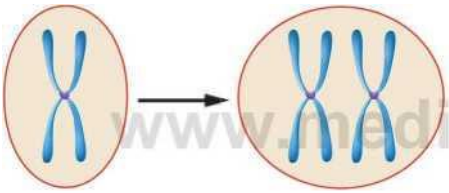


30. Nondisjuncția mitotică a contribuit probabil la condiția mozaic. Dacă unul dintre cromozomii X nu ar fi inclus într -o celulă fiică în timpul clivajului mitotic, atunci o proporție substanțială din celulele copilului ar fi XO. Expresia caracteristicilor sindromului Turner ar depinde de procentul și locația populației de celule XO.

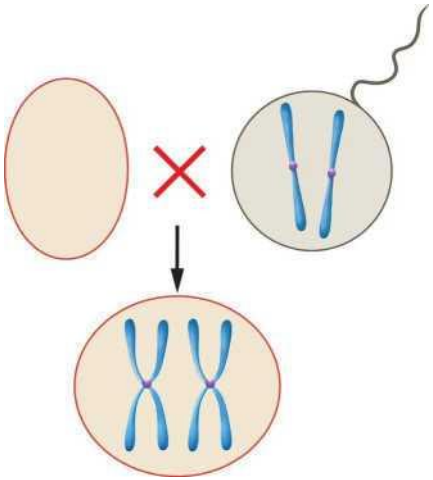
32. *Salvarea trisomică* este o afecțiune în care inițial este prezent un zigot trisomic , dar se pierde un cromozom specific. În diagrama de mai jos, doi cromozomi provin inițial de la tată (albastru) și unul de la mamă (portocaliu). Cromozomul matern a fost îndepărtat în timpul mitozei, rămânând cei doi cromozomi paterni.



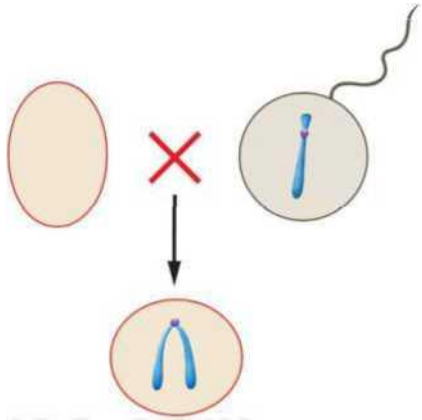
Salvarea monosomică are loc atunci când inițial există un singur cromozom prezent într-un zigot și apoi un duplicat al acelui cromozom vine să umple golul, de obicei din cauza non-disjuncției mitotice.



Complementarea gametică are loc atunci când o celulă căreia îi lipsește oricare dintre omoloagele unui anumit cromozom este fertilizată de un gamet care are două copii ale acelui omolog . Zigotul rezultat va conține doi cromozomi omologi de la unul dintre părinți.



Formarea *unui izocromozom* Acest lucru se întâmplă atunci când un cromozom conține două copii ale unui braț și și-a pierdut omologul . Această pierdere a omologului poate apărea în timpul mitozei sau meiozei. Izocromozomul compensează condiția nulisomică . Practic, cromozomul este „uniparental" deoarece cea mai mare parte a materialului cromozomial al unui anumit omolog provine de la unul dintre părinți.



Capitolul 9

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

9.1 Tulpina mt este donatoarea de ADNcp, deoarece moștenirea rezistenței sau sensibilității depinde de starea genei mt $^{+}$. La acest organism, cloroplastele își dobândesc caracteristicile de la tulpina *mt* $^{+}$, în timp ce mitocondriile își dobândesc caracteristicile de la *tulpina mt*~ .

9.2 (a) Neutru.
(b) Segregaționale (mutații nucleare).
(c) Supresiv.

9.3 În multe cazuri, componentele moleculare ale mitocondriilor sunt extrase din citoplasmă, fiind sintetizate din gene nucleare .

9.4 Din perspectiva organismului , indivizii cu cele mai severe defecte mitocondriale tind să aibă un succes reproductiv mai mic . La nivel celular , mitocondriile cu mutații în genele care codifică proteinele tind să fie eliminate . Această selecție purificatoare tinde să favorizeze mitocondriile non-mutante.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Modelul de moștenire este , de obicei , în majoritatea cazurilor , de la un părinte la urmaș. Nu este obișnuit să se vadă ambii părinți contribuind la caracteristicile urmașului , așa cum este cazul în moștenirea mendeliană (cromozomială) . Raporturile mendeliene standard (3:1) nu sunt de obicei observate. În general, rezultatele încrucișărilor reciproce diferă .

Femelă mutantă Masculsălbatic X
Toți descendenții mutanți

Femelă sălbatică X *Mascul mutant Toți* urmașii sălbatici

În moștenirea legată de sex , modelul este de obicei transmis de la bunic la copil prin intermediul mamei purtătoare . Modelele de moștenire extranucleară nu sunt de obicei influențate de sexul individului .

4. Deoarece ovulul furnizează citoplasma embrionului și, prin urmare , cloroplastelor , urmașii vor avea același fenotip ca și planta care furnizează ovulul .
   (a) verde
   (b) alb
   (c) alb, pestriț sau verde
   (d) verde

6. Dacă cele două tulpini sunt încrucișate așa cum este descris în problemă, atunci în zigotul diploid, alela *segregațională ar fi de așteptat* să fie „acoperită" de alelele normale ale tulpinii neutre. Pe de altă parte, deoarece genele nucleare sunt din nou „expuse" în starea haploidă a ascosporilor , *ar fi de așteptat un* raport de 1:1 între normale și mici. Fenotipul mic Aceasta este cauzată de gena nucleară segregațională .

8. Faptul că toți urmașii (F,) prezintă un model de înfășurare dextrogiră a cochiliei indică faptul că unul dintre părinți (cel care acționează ca mamă) are alela D. Luând acești urmași și observând că urmașii lor (numiți F2) apar în raportul 1 : 1 , se indică faptul că jumătate dintre urmași (F ( ) sunt *dd.* Pentru a obține aceste rezultate, unul dintre părinți trebuie să fi fost *Dd,* în timp ce celălalt trebuie să fi fost *dd.*

10. Întrucât nu există dovezi ale unor modele tipice de segregare pentru genele cromozomiale și trăsăturile mendeliene, pare posibilă o formă de moștenire extranucleară. Dacă gena *apatică* este dominantă, atunci poate fi implicat un efect matern . În acest caz , unii dintre urmașii F1 ar fi hiperactivi , deoarece efectul matern este doar temporar , afectând doar urmașii imediați . Dacă starea apatică este cauzată de un agent infecțios, atunci experimentele de injectare ar putea fi utile . Dacă este cauzată de un defect mitocondrial, atunci afecțiunea va persista la toți urmașii mamelor apatice pentru mai mult de o generație.

12. Teoria endosimbiotică afirmă că mitocondriile și cloroplastele au apărut independent acum aproximativ 2 miliarde de ani , din protobacterii libere . Aceste bacterii au oferit celulelor eucariote primitive capacitatea de respirație aerobă și fotosinteză . Deoarece aceste organite au origini procariote , este posibil să înțelegem mai bine ADN-ul extranuclear .

14. Fenomenele de dezvoltare care apar într -un stadiu incipient sunt mai susceptibile de a fi sub influența maternă decât cele care apar ulterior . Orientările anterioară /posterioară și dorsală/ventrală sunt printre primele stabilite , iar la organismele în care studiul experimental și/sau genetic este fezabil, acestea prezintă adesea o influență maternă considerabilă. Genele afectate matern produc produse care nu sunt transmise mai departe de o generație, așa cum este cazul organitelor și al moștenirii infecțioase . Următoarele încrucișări ilustrează natura tranzitorie a unui efect matern .

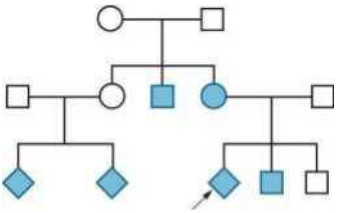
AA Feminin X *aa* ----------masculin > toți descendenții

Teste cu fenotipul „A". Luați o femelă cu fenotipul A din încrucișarea anterioară și efectuați următoarea încrucișare (rețineți că doar jumătate din urmașii încrucișării anterioare vor fi *aa): aa* X mascul *Aa* .

Toți urmașii vor avea *fenotipul* „a", deoarece toți urmașii vor reflecta genotipul al mamei, nu al fenotipului ei . Această încrucișare ilustrează faptul că efectele materne durează doar o generație. În practică , rezultatele acestei încrucișări ar putea produce un raport tipic de 1:1, deoarece mama ar putea fi *Aa* . sau *aa.*

16. Datorită erorii de eșantionare rezultată din numărul relativ mic de urmași, acest pedigree ar putea reprezenta o genă mendeliană tipică, fie dominantă, fie recesivă. Totuși , deoarece acest capitol se concentrează pe moștenirea extranucleară, afecțiunea este cel mai probabil un caz de moștenire extranucleară. Fenotipul urmașilor (de la II-4 și de la II -5) va urma , prin urmare, caracteristicile mamei, care în acest caz sunt toate normale.

18. (a) Rețineți că , pentru a oferi o genealogie semnificativă, am adăugat la aceasta mai multe persoane care nu sunt enumerate în tabel. Consultați Capitolul 3 pentru informații privind simbolurile utilizate .



(b, c) Dacă examinăm doar pedigree- ul de mai sus , am putea argumenta că acesta este un model recesiv mendelian tipic . Dacă acesta este cazul, toți indivizii care nu prezintă fenotipul ar fi heterozigoți. Cu toate acestea, deoarece a fost identificată o mutație a ADN-ului mitocondrial la membrii familiei afectați, pedigree-ul este, de asemenea, în concordanță cu moștenirea organelelor . Heteroplasmia explică variațiile în expresie și transmitere. Deși la prima vedere acest lucru poate părea o concluzie falsă, luați în considerare gama de mitocondrii mutante prezentată în tabel. Bunica maternă are 56% ADNmt mutant și ar putea transmite o populație mixtă de mitocondrii urmașilor săi , dintre care doi sunt simptomatici și au procente de ADNmt mutant care depășesc 90 % . Cei doi veri materni (de sex necunoscut) au moștenit aleatoriu seturi de mitocondrii cu

frecvențe relativ mari (90 și 91%) de ADNmt mutat și , prin urmare, sunt simptomatici. Se pare că pragul pentru expresia fenotipică este de 85%.

(d) Transmiterea unei trăsături prin moștenire organite are loc în principal prin intermediul mamei, în timp ce mutațiile monogenice (albinismul) pot fi transmise de ambii părinți. În plus, din cauza heteroplasmiei, expresia fenotipică poate varia, iar modelele de moștenire pot complica interpretarea pedigreelor.

Capitolul 10

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

10.1 În teorie, designul general ar fi adecvat, în sensul că , dacă ar fi marcată, o parte din substanță ar apărea în urmașii bacteriilor transformate. Cu toate acestea, deoarece cantitatea de ADN transformat este extrem de mică în comparație cu ADN-ul genomic al bacteriei receptoare și al urmașilor acesteia, ar fi dificil din punct de vedere tehnic să se localizeze acidul nucleic marcat în analize . În plus, ar fi necesar să se asigure că micul fragment de ADN responsabil pentru transformarea genetică a fost într-adevăr marcat.

10.2 Guanină = 17,5%. Adenină și timină = ambele 32,5%.

10.3 Presupunând că valoarea 1,13 este statistic diferită de 1,00, putem concluziona că rubeola este un virus ARN monocatenar.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. *Replicare* Replicarea este procesul care duce la generarea de copii identice ale informațiilor genetice existente. Deoarece celulele fiice conțin în esență copii exacte (cu unele excepții) ale informațiilor genetice ale celulei-mamă și deoarece, datorită producerii și unirii gameților, urmașii conțin copii (cu variații) ale informațiilor genetice ale părinților lor, materialul genetic trebuie să facă copii ale sale (adică să se replice). Replicarea are loc în timpul fazei S a interfazei. Materialul genetic este capabil să se exprime prin producerea unui fenotip . Prin transcripție și traducere , se fabrică proteine care contribuie la fenotipul organismului . Materialul genetic trebuie să fie suficient de stabil pentru a menține informațiile „stocate” și să le poată transmite de la o celulă la alta și de la un organism la altul . Deoarece materialul genetic nu este consumat în timpul proceselor de transcripție și traducere, informațiile genetice pot fi stocate și utilizate continuu . Am afirmat anterior că materialul genetic trebuie să fie suficient de stabil pentru a stoca informații genetice; cu toate acestea, variațiile datorate *mutației* oferă elementele constitutive ale evoluției. Materialul genetic este capabil să sufere diverse modificări atât la nivel cromozomial, cât și la nivel nucleotidic .

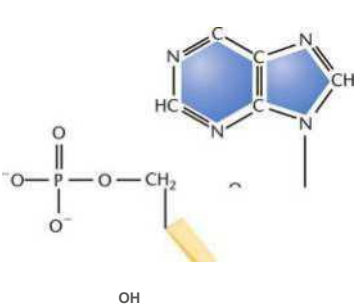
4. Griffith a efectuat experimente cu diferite tulpini de *Diplococcus pneumoniae* în care un agent patogen distrus termic , atunci când a fost injectat într-un șoarece care conținea o tulpină vie, nepatogenă , a dus în cele din urmă la moartea animalului . Un rezumat al acestui experiment este prezentat în text . Examinarea șoarecelui mort a relevat bacterii patogene vii . Griffith a sugerat că bacteriile virulente (patogene) distruse termic au transformat tulpina nevirulentă (nepatogenă) într -o tulpină virulentă. Avery și colegii săi au căutat sistematic principiul transformator prezent în tulpina patogenă distrusă termic și au stabilit că acesta era ADN-ul. Taylor a demonstrat că bacteriile transformate sunt capabile să servească drept donatori de ADN transformant , indicând faptul că procesul de transformare implică o modificare stabilă a materialului genetic (ADN).

6. Acizii nucleici conțin cantități mari de fosfor și nu conțin sulf , în timp ce proteinele conțin sulf și nu conțin fosfor. Prin urmare, radioizotopii ^{32P} și ^{35S} vor permite marcarea selectivă a acizilor nucleici , respectiv a proteinelor .

Experimentul Hershey - Chase s - a bazat pe premisa că substanța injectată în bacterie este substanța responsabilă de generarea urmașilor fagilor și , prin urmare, trebuie să fie materialul ereditar. Experimentul a demonstrat că cea mai mare parte a materialului marcat cu ^{32P} (ADN) fusese injectată, în timp ce fantomele fagilor (învelișurile proteice) au rămas în afara bacteriei . Prin urmare, acidul nucleic trebuie să fie materialul genetic.

8. Dovezile inițiale ar fi considerate indirecte, în sensul că nu a fost efectuat vreodată niciun experiment , cum ar fi transformarea bacteriană , în care informațiile genetice să fie transferate de la un organism la altul folosind ADN. Mai degrabă , dovezile au provenit din compararea ADN-ului în diferite tipuri de celule (spermatozoizi și celule somatice) și observarea spectrelor de acțiune și *absorbție* . Întrucât efectele luminii ultraviolete erau corelate, ADN-ul a fost considerat a fi materialul genetic . Această sugestie a fost susținută de faptul că se demonstrase că ADN-ul este materialul genetic în bacterii și la unii fagi. Dovezile directe că ADN-ul este materialul genetic provin din diverse observații, inclusiv transferul de gene , care este acum posibil datorită tehnicilor de ADN recombinant .

10. Structura acidului dezoxiadenilic este prezentată mai jos și, de asemenea , în text. Legăturile dintre cele trei componente necesită eliminarea apei (H_2O).



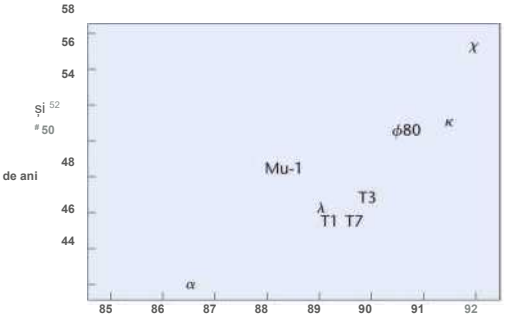
12. Guanină: 2-amino-6-oxipurină Citozină: 2-oxi-4-aminopirimidină Timină: 2,4-dioxi-5-metilpirimidină Uracil: 2,4-dioxipirimidină
14. Câteva caracteristici ale modelului dublu helix Watson-Crick pentru ADN: Compoziția bazelor este astfel încât A = T, G = C și (A + G) = (C + T). Bazele sunt suprapuse la o distanță de 0,34 nm (3,4 Å), cu un aranjament plecton antiparalel . Există o rotație completă la 3,4 nm, ceea ce implică 10 baze pe rotație. Cele două lanțuri polinucleotidice sunt ținute împreună prin legături de hidrogen, aceste lanțuri fiind compuse din legături fosfodiesterice între zaharurile cu cinci atomi de carbon și fosfați. Există două legături de hidrogen care formează perechea A-T și trei care formează perechea G-C. Dubla helix este o structură spiralată cu un diametru de aproximativ 20 Å, cu o topografie cu șanțuri majore și minore. Bazele hidrofobe sunt situate în centrul moleculei , în timp ce structura hidrofilă fosfodiesteric este la exterior.
16. Întrucât ADN-ul bicatenar A = T și G = C (în limitele erorii experimentale), datele prezentate ar fi indicat o lipsă de împerechere a acestor baze, în favoarea unei structuri monocatenare sau a unei alte structuri neunite prin legături de hidrogen.
    Alternativ, datele ar părea să indice că A = C și T = G, ceea ce ar nega posibilitatea formării unor legături de hidrogen tipice, deoarece relațiile dintre sarcinile opuse nu ar exista. Prin urmare, formarea oricărui tip de structură elicoidală închisă este puțin probabilă. În concluzie, Watson și Crick ar fi putut concluziona că legăturile de hidrogen nu sunt un factor semnificativ în menținerea unei structuri dublu catenare.
18. Cele trei diferențe principale dintre ADN și ARN sunt următoarele:
    1. Uracilul din ARN înlocuiește timina din ADN.
    2. Riboza din ARN înlocuiește dezoxiriboza din ADN.
    3. ARN-ul apare adesea atât în forme monocatenare, cât și parțial bicatenare, în timp ce ADN-ul apare în general sub formă bicatenară.
20. Bazele azotate ale acizilor nucleici (nucleozide, nucleotide și polinucleotide monocatenare și bicatenare) absorb cantitatea maximă de lumină UV la lungimi de undă între 254 și 260 nm. Folosind acest fenomen, se poate determina adesea prezența și concentrația acizilor nucleici într-un amestec . Deoarece absorbția maximă de UV a proteinelor are loc la 280 nm, aceasta este o modalitate relativ simplă de a analiza amestecuri de molecule importante din punct de vedere biologic. Absorbția UV este mai mare în moleculele monocatenare (variație hipercromă) în comparație cu structurile bicatenare, astfel încât, aplicând condiții de denaturare, este ușor de determinat dacă un acid nucleic este în formă monocatenară sau bicatenară. În plus, ADN-ul bogat în AT se denaturează mai rapid decât ADN-ul bogat în GC, astfel încât conținutul de baze poate fi estimat folosind cinetica denaturării.
22. ADN-ul bicatenar este transformat în ADN monocatenar.
24. Deoarece perechile de baze GC se formează cu trei legături de hidrogen, iar perechile de baze AT se formează cu doar două, este necesară mai multă energie (o temperatură mai ridicată) pentru a separa perechile GC.
26. Într-una dintre propozițiile articolului lui Watson și Crick din revista Nature , aceștia afirmă:

    > „Nu ne-a scăpat faptul că împerecherea bazelor pe care am postulat-o sugerează imediat un posibil mecanism de copiere a materialului genetic.”

28. Partea stângă (a) = dextrogitator, partea dreaptă (b) — levorgitator.
30. În aceste condiții, 5-metilcitozina hidrolizată este transformată în timină.
32. Unul dintre principiile de bază ale electroforezei în gel este acela că moleculele mai scurte migrează mai repede printr-un gel decât cele mai lungi. Deși diverși factori, alții decât concentrația de acrilamidă, influențează acest lucru, în funcție de lungimea gelului, ar putea fi avantajos să se utilizeze o formulă de 12% acrilamidă, astfel încât fragmentele mai scurte să nu ajungă la capătul gelului și să intre în rezervor înainte ca fragmentele mai lungi să părăsească godeurile.
34. Fără a cunoaște caracteristicile exacte de legare ale hipoxantinei cu xantina, ar putea fi dificil de prezis probabilitatea fiecărui tip de împerechere. Este probabil ca ambele să fie din aceeași clasă (purină sau pirimidină), deoarece denumirile moleculelor indică o similaritate. În plus, diametrul structurii este constant, ceea ce este de așteptat cu modelul utilizat. De fapt, atât hipoxantina, cât și xantina sunt purine.
    Întrucât există cantități egale de A, T și H, s-ar putea sugera că acestea sunt legate prin legături de hidrogen; același lucru se poate spune și despre C, G și X. Având în vedere echivalența molară a nitrozei și fosfatului, o structură alternativă zahăr-fosfat-zahăr, ca în ADN-ul „asemănător Pământului”, ar fi acceptabilă. Un model cu triplă helix ar fi acceptabil, deoarece diametrul este constant. Având în vedere asemănările chimice cu ADN-ul „asemănător Pământului”, este probabil ca ADN-ul acestei creaturi ciudate să urmeze același plan structural.
36. Modul în care este formulată întrebarea sugerează că ADN-ul care se separă electroforetic are aceeași formă (o tijă alungită). În realitate, ADN-ul poate exista într-o varietate de forme, așa cum putem observa în plasmidele superînrăsucite, plasmidele relaxate (crestate) și moleculele liniare. Comparațiile de dimensiuni cu ADN-ul ar trebui să fie astfel încât moleculele liniare să fie comparate cu moleculele liniare, moleculele superînrăsucite cu moleculele superînrăsucite și așa mai departe. Atunci când se compară migrarea ADN-ului cu ARN-ul, chiar dacă moleculele de ARN au aceleași raporturi sarcină-masă, ele vin și într-o varietate de forme. Împerecherea bazelor complementare intracatenare poate duce la formarea unor structuri mai compacte în comparație cu

conformația mai relaxată, deschisă. Pentru comparațiile electroforetice de dimensiuni, moleculele de ARN trebuie denaturate pentru a elimina variabilele structurale secundare.

38. În general, pe măsură ce procentul de perechi GC crește, crește și *T_m* . Acest lucru este de așteptat, deoarece există trei legături de hidrogen care țin împreună perechile GC în loc de două care țin împreună perechile AT: prin urmare, este necesară mai multă energie pentru a rupe perechile GC decât perechile AT.



Capitolul 11

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

11.1 După un ciclu de replicare în mediu W_2N, putem exclude modelul conservativ . După un ciclu de replicare în U_2N sub un model dispersiv, ADN-ul are o densitate intermediară, ca în modelul semiconservativ . Cu toate acestea, în următorul ciclu de replicare în mediu ^{14}N , densitatea ADN-ului se situează între densitățile intermediare și „ușoare”, excluzând astfel modelul dispersiv.

11.2 Dacă ADN-ul ar conține catene paralele în dubla helix și polimeraza ar putea lucra cu aceste catene paralele, ar exista o sinteză continuă și nu ar exista fragmente Okazaki. Există și alte câteva posibilități. Dacă ADN-ul s-ar replica sub formă de catene simple, sinteza ar putea începe la capetele libere și nu ar fi nevoie de fragmente Okazaki.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. *Conservator:* În modelul conservator, dubla spirală originală rămâne ca o unitate completă, iar noua dublă spirală a ADN-ului este produsă ca o singură unitate. Vechiul ADN este complet conservat.
Semiconservativă: fiecare helix fiică este compusă dintr-o catenă de ADN vechi și o catenă de ADN nou. Ruperea legăturilor de hidrogen este necesară.
Dispersiv: În modelul dispersiv, spirala ADN originală se descompune în fragmente, iar noul ADN din spirala fiică se amestecă cu fragmente ale vechiului ADN. Acest model de replicare necesită separarea legăturilor fosfodiesterice covalente individuale.

4. (a) Într -un model conservator, tot ADN- ul nou marcat ar merge la o cromatidă soră, în timp ce cealaltă cromatidă ar rămâne nemarcată. Spre deosebire de un model semiconservator , primul ciclu de replicare ar produce o cromatidă soră , care ar avea ambele catene ale dublei spirale marcate .
(b) Într -un model dispersiv, tot ADN-ul nou marcat ar fi intercalat cu ADN-ul nemarcat . Deoarece aceste preparate (cromozomi în metafază) sunt structuri extrem de spiralate și condensate, derivate din cea mai „extinsă” formă existentă în interfază (care include faza S) , este imposibil să se detecteze zonele nemarcate . În schimb , ambele cromatide surori ar apărea ca structuri marcate omogen .

6. Replicarea *in vitro* necesită o matriță de ADN, un cation divalent (Mg^{++}) și cei patru dezoxiribonucleozidici trifosfați : dATP, dCTP, dTTP și dGTP. Litera mică „d” se referă la dezoxiriboza.

8. Întrucât compoziția *bazelor* Poate fi similar fără a implica neapărat o similaritate a secvențelor; testul cel mai puțin strict a fost compararea compozițiilor bazelor . Comparând *frecvențele vecinilor cei mai apropiați , Kornberg* a stabilit că era foarte probabil ca produsul să aibă aceeași secvență de baze ca și șablonul.

10. Pentru ca următorul nucleotid să se atașeze , este necesară o grupare 3' OH accesibilă . Gruparea 3' OH este în cele din urmă îndepărtată sub formă de apă, formând o legătură covalentă cu fosfatul 5' al nucleotidului adăugat.

12. Cele trei enzime au câteva proprietăți comune . În primul rând , niciuna dintre ele nu poate iniția sinteza ADN-ului conform unei matrițe , dar toate pot *alungi o* catenă de ADN existentă , presupunând că este prezentă o catenă matriță . Polimerizarea nucleotidelor are loc în direcția 5 ' către 3' , fiecare fosfat 5 ' fiind adăugat la capătul 3' al polinucleotidului în creștere .

Cele trei enzime sunt complexe proteice mari , cu o greutate moleculară mai mare de 100.000 de daltoni și toate au activitate exonucleazică de la 3' la 5' . Vezi textul.

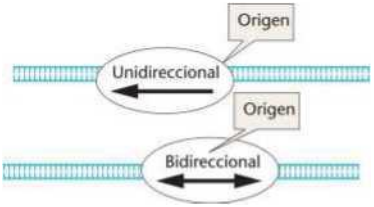
ADN polimeraza I:
Activitatea exonucleazei 5' — » 3'
prezent în cantități mari , relativ stabil , îndepărtează primerul ARN

ADN polimeraza II: posibil implicată în funcția de reparare

ADN polimeraza III: esențială pentru replicarea unei molecule complexe

14. Dat fiind un segment de ADN bicatenar, sinteza ar putea începe într- un punct specific, iar catenele s-ar putea replica într- o singură direcție (unidirecțională) sau în ambele direcții (bidirecțională), așa cum se arată mai jos . Rețineți că, în text , sinteza catenelor complementare are loc continuu (5' la 3') pe catena conducătoare , în direcția furcii de replicare și

discontinuu *(5'* la 3') pe catena întârziată, în direcția *opusă furcii* de replicare. O astfel de replicare discontinuă are ca rezultat fragmente Okazaki.



16. (a) *Fragmentele Okazaki* sunt fragmente de ADN relativ scurte (între 1.000 și 2.000 de baze la organismele procariote) care sunt sintetizate discontinuu pe catena întârziată în timpul replicării ADN-ului. Aceste fragmente par a fi necesare deoarece nu este disponibilă nicio matriță de ADN pentru sinteza 5'-3' până când nu a avut loc un anumit grad de sinteză continuă a ADN-ului pe catena conducătoare în direcția furcii de replicare. Izolarea acestor fragmente oferă dovezi care susțin modelul de replicare prezentat în text.
    (b) ADN *ligaza* este necesară pentru a forma legături fosfodiesterice în golurile create atunci când ADN polimeraza I îndepărtează primerul ARN și întâlnește ADN nou sintetizat. Lanțurile discontinue de ADN sunt apoi unite într-o singură catenă continuă.
    (c) *Primerul* ARN este sintetizat de ARN primaza pentru a servi ca punct de plecare pentru producerea de catene de ADN conform unui șablon ADN. Niciuna dintre ADN polimeraze nu poate iniția sinteza fără o grupare 3'-hidroxil liberă. Primerul ARN furnizează această grupare și, prin urmare, poate fi utilizat de ADN polimeraza III.
18. ADN-ul eucariot se replică într-un mod foarte similar cu cel al *E. coli.* Sinteza este bidirecțională, continuă pe o catenă și discontinuă pe cealaltă, iar cerințele pentru sinteză (patru dezoxiribonucleozid trifosfați, un cation divalent, o matriță și un primer) sunt aceleași. Fragmentele Okazaki din organismele eucariote au aproximativ o zecime din dimensiunea celor din bacterii.

Deoarece există o cantitate mult mai mare de ADN de replicat și deoarece replicarea ADN-ului este mai lentă, eucariotele au mai multe situsuri de inițiere a replicării (și mai multă ADN polimerază per celulă) în comparație cu originea unică a replicării din organismele procariote. Replicarea are loc în situsuri diferite în timpul diferitelor intervale ale fazei S.

20. (a) Nu există reparare prin ADN polimeraza I și/sau ADN polimeraza III. (b) Nu există activitate de ADN ligază. (c) Nu există activitate de primază. (d) Este prezentă doar activitate de ADN polimerază I. (e) Nu există activitate de ADN girază.
22. *Conversia genetică* este probabil o consecință a recombinării genetice, în care recombinarea nereciprocă generează produse în care o alelă pare să fie

„Se transformă" în altul. Conversia genetică este considerată în prezent a fi rezultatul formării unui heteroduplex însoțit de nepotriviri de baze. Atunci când aceste nepotriviri sunt corectate, are loc „ conversia". Activitatea telomerazei se găsește în țesutul germinal pentru a menține lungimea telomerilor de la o generație la alta. Cu alte cuvinte, telomerii nu se pot scurta la nesfârșit fără a eroda informațiile genetice.

Dacă repetarea ar fi conservatoare, primele autoradiografii (metafază I) ar avea marcajul distribuit doar pe o singură parte (cromatidă) a cromozomului în metafază, așa cum se arată mai jos.

Repetare conservatoare

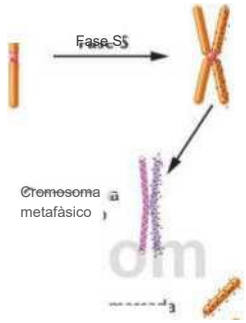
Legendă Cromatidă marcată

24.

poate conține ADN cu catenă paralelă sau monocatenar . În ambele - cazuri, problema telomerilor ar apărea la un capăt al cromozomului. Deoarece ADN-ul procariot este în general circular și, prin urmare, nu are
26. capete libere , organismul extraterestru este cel mai probabil eucariot. Regrefarea conservatoare poate fi exclusă .

În tulpina A, sinteza ADN-ului este redusă atât la 30 , cât și la *42* °C, ceea ce indică faptul că *tulpina A* este sensibilă la temperatură. În plus, tulpina A este sensibilă la novobiocină . Prin urmare, tulpina A este *gyi** Tulpina *B* este rezistentă la novobiocină, dar este sensibilă la temperatură și, prin urmare

Cromosoma G1 Cromosoma metafàsico



Cromátida no marcada

28. *, este gyr** T.* Tulpina *C* Este sensibilă la novobiocină, dar nu și la temperatură, deci este de tip sălbatic . Tulpina *D este* rezistentă la novobiocină și nu este sensibilă *la* temperatură și, prin urmare , este gyf .

34.

Linia de bază marcată inițial	*Busă marcată după digestie cu fosfodiesterază splenic*	
	ANTI-PARALEL	PARALEL
G.	LA	CT
30.	GAG	G,A
32. C.	CTG	C, T, A, G
T.	T,C»A,T	T, C, A, G
LA		

Modelul care apare în natură poate fi determinat prin compararea tiparului în care fosfatul marcat este deplasat după digestie cu fosfodiesterază în splină. Luați în considerare modelul antiparalel și observați că frecvența cu care „C" (de exemplu) este vecinul 5' al „G" nu coincide neapărat cu frecvența cu care „G" este vecinul 5' al „C". Cu toate acestea , în modelul paralel (b), frecvența cu care „C*" este vecinul 5' al „G" coincide cu frecvența cu care „G" este vecinul 5' al „C". Examinarea acestor „frecvențe de digestie" relevă faptul că ADN-ul există în polaritatea opusă.

Capitolul 12

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

12.1 Având un cromozom circular, nu există capete libere care prezintă problema cromozomilor liniari, adică replicarea completă a secvențelor terminale.

12.2 Întrucât cromozomii eucarioți sunt „multireplicativi" în sensul că există mai multe furci de replicare de-a lungul lor , ne -am aștepta să vedem mai multe grupuri de radioactivitate dacă marcarea se efectuează pe o perioadă scurtă de timp.

12.3 Volumul miezului = 4/3 nr ^{3}

$$= 4/3 \text{ X } 3{,}14 \text{ X } (5 \text{ X } 10^{3\ nm})^{3} = 5{,}23 \text{ X } 10\text{H}^{nm^3}$$

Volumul cromozomului = nr² ^{X} lungime

= 3,14 x 5,5 nm x 5,5 nm x (2 x $^{10^6\ nm}$)
- 1,9 x 10" $^{nm^3}$

Prin urmare, procentul din volumul nucleului ocupat de cromatină este:

= (1,9 X ^{IO11} nn? / 5,23 X io" nm3) X ^{100}

= aproximativ 36,3%

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Bacteriofagul X are ADN liniar, bicatenar, atunci când se află în capsida fagului , iar după infecție, se închide pentru a forma un cromozom circular. Acesta conține aproximativ 50 kb. Fagul T2 are, de asemenea, un cromozom ADN liniar, bicatenar; dimensiunea sa este mai mică de 200 kb. *E. coli* Are un cromozom ADN circular, bicatenar, de aproximativ 4,2 x 10^{-1} kb. Ambii fagi intacți au aproximativ 1/50 din dimensiunea E. coli. Deoarece fagii sunt paraziți obligați ai bacteriilor, aceștia depind de gazdele lor pentru materialele necesare replicarii lor . Bacteriile conțin *toate informațiile* genetice pentru metabolism , replicare și sinteza de novo a numeroase *materiale* care susțin funcțiile vitale . Fagii, pe de altă parte, conțin relativ puține gene - în special, cele necesare pentru adsorbția, injectarea și generarea de urmași, utilizând în principal materiale bacteriene.

4. Majoritatea pufurilor reprezintă gene active, după cum reiese din colorarea și absorbția precursorilor ARN marcați, demonstrate în experimentele prin *autoradiografie* .

6. Cromozomii perie sunt de obicei prezenți în ovocitele vertebratelor . Se găsesc și în spermatocitele unor insecte. Apar ca structuri în stadiu diploten și sunt versiuni active, neînfășurate , ale cromozomilor meiotici condensați.

8. Digestia cromatinei de către endonucleaze, cum ar fi mononucleaza micrococică, produce fragmente de ADN de aproximativ 200 de perechi de baze sau multipli ai acestora. Datele de difracție cu raze X indică o spațiere regulată a ADN-ului în cromatină. Microscopia electronică a permis identificarea unor structuri asemănătoare perlelor, distanțate regulat (nodozomi).

10. Pe măsură ce are loc condensarea cromozomilor , se formează o fibră de 300 Å . Se pare că este compusă din 5 sau 6 nucleozomi spiralați . Această structură se numește solenoid. Aceste fibre formează o serie de bucle care se condensează în continuare în fibra de cromatină și apoi se spiralează pentru a forma brațele cromozomiale care alcătuiesc fiecare cromatidă .

12. (a) Deoarece există 200 de perechi de baze per nudeosom (așa cum este definit în această problemă) și ^{109} perechi de baze , ar exista 5 x 10^{6} nudeozomi · (b) Deoarece există 5 x $^{10^6}$ Nudeosomi și nouă histone (inclusiv H1) per nudeosom, trebuie să existe 9 (5 x 10^{6}) molecule de histonă : 4,5 x 10^{9}. (c) Deoarece sunt ^{prezente} 10^{9} perechi de baze și fiecare pereche de baze este echivalentă cu 3,4 Å, lungimea totală a ADN-ului va fi de 3,4 X 10 ^{9} A. Împărțind această valoare la rata de împachetare (50) obținem 68 x io ^{7} A.

14. O pereche de baze ocupă 0,34 nm, prin urmare ecuația ar fi următoarea:

52 pm/(0,34 nm/pb) X 1.000 nm/pm
= 152.941 perechi de baze

16. (a) Deoarece pseudogenele nu produc un fenotip observabil , acestea nu pot fi identificate prin analiza clasică a mutațiilor. În absența unui produs, identificarea pseudogenelor se bazează în principal pe o analiză amănunțită a bazelor de date cu secvențe de ADN pentru a identifica segmente de ADN care seamănă cu gene funcționale. În plus, căutarea secvențelor ORF și/sau exonilor este imposibilă din cauza mutațiilor care au dat naștere pseudogenelor . (b) Deoarece spațierea genelor, plierea cromatinei și diverse domenii de amortizare/amplificare a cromozomilor interacționează în mod clar cu funcția genomică normală , pseudogenele pot juca roluri importante în promovarea sau inhibarea acestor interacțiuni. Dovezi recente indică faptul că ceea ce poate părea a fi o pseudogenă inactivă într-un mediu (țesut sau organism) ar putea avea o funcție în altul. Unele pseudogene sunt transcrise și pot juca un rol în reglarea genelor.

18. În primul rând, modelele de metilare prezentate de o anumită boală trebuie să fie stabile și să nu se modifice excesiv în timp . În al doilea rând, deoarece modelele de metilare a ADN-ului diferă de la un individ la

altul, modelele specifice trebuie să fie caracteristice bolii și nu individului. În al treilea rând , deoarece modificările modelelor de metilare a ADN-ului legate de boală implică adesea sute de gene, interpretarea corectă a detaliilor modelului necesită cunoștințe care nu ne sunt disponibile în prezent. Cu toate acestea, se înregistrează unele progrese.

20. Celulele canceroase suferă diverse modificări în acetilarea histonelor în comparație cu celulele normale. Acetilarea excesivă (hiperacetilarea) este adesea asociată cu o activitate genetică crescută. Scopul introducerii inhibitorilor HDAC este de a reduce, în general, această activitate genetică. Deși mecanismul de acțiune al inhibitorilor HDAC nu este încă pe deplin înțeles, se crede că aceștia acționează prin promovarea stopării ciclului celular prin reducerea producției unui număr relativ mic de gene.

22. Relațiile strânse dintre histone, nucleozomi și ADN din cromatină sunt în mod clar responsabile de remodelarea structurală a cromozomilor pe măsură ce ciclul celular progresează de la interfază la metafază. Faptul că nucleozomii sunt asociați cu cromatina în perioadele de activitate genică ridică întrebarea despre posibilele lor roluri în influențarea nu numai a structurii cromozomilor, ci și a funcției genelor. Constatarea că modificarea chimică naturală a componentelor nucleozomale, așa cum este indicată în întrebare, crește activitatea genelor sugerează că modificările în legarea nucleozomilor la ADN (în acest caz datorită metilației) fac genele mai accesibile anumitor factori care promovează funcția genelor. În plus, ideea că heterocromatina, care conține mai puține și mai multe gene reprimate, este submetilată susține în continuare ideea că modificarea histonei este funcțional legată de modificările activității genelor.

24. Presupunând o distribuție aleatorie, împărțirea a 3 x 10^9 perechi $^{\text{de baze}}$ la 10 b ^{da} aproximativ 3.000 de perechi de baze sau 3 kbp între *secvențele Alu.*

26. Distribuția microsateliților variază în funcție de taxoni. Microsateliții sunt mai frecvenți în genele drojdiilor și fungilor și destul de rari în genele mamiferelor. Se pare că există o reducere generală a microsateliților intragenici în organismele care au evoluat mai recent.

28. În toate cazurile, urmașii includ cel puțin un locus de la tată și unul de la mamă, ceea ce este de așteptat dacă presupusul tată este tatăl real. Fără informații despre frecvența fiecărui marker în populația generală, este dificil să se tragă concluzii definitive.

Capitolul 13

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

13.1 (a) Modul de a determina fracția fiecărui triplet care va apărea cu un sistem de încorporare aleatorie este de a determina probabilitatea ca fiecare bază să apară în fiecare poziție a codonului (prima, a doua , a treia) și apoi de a înmulți probabilitățile (fracțiile) individuale pentru a obține o probabilitate (fracție) finală.

GGG = 3/4 X 3/4 X 3/4 = 27/64
GGC = 3/4 X 3/4 X 1/4 = 9/64
CMGC = 3/4 X 1/4 X 3/4 = 9/64
CGG = 1/4 X 3/4 X 3/4 = 9/64
CCG = 1/4 X 1/4 X 3/4 = 3/64
CGC = 1/4 X 3/4 X 1/4 = 3/64
CCG = 3/4 X 1/4 X 1/4 = 3/64
CCC = 1/4 X 1/4 X 1/4 = 1/64

(b) Glicină:

GGG și un G $_2$ C (suma 36/64)

Alanină:

a G $_2$ C și a C $_2$ G (suma 12/64)

Arginină:

a G $_2$ C și a C $_2$ G (suma 12/64)

Prolină:

a C $_2$ G și CCC (suma 4/64)

(c) Cu ipoteza oscilației, poate apărea o variație în a treia poziție a fiecărui codon.

Glicină: GGG, GGC

Alanina: CGG, GCC, CGC, GCG Arginina: GCG, GCC, CGC, CGG Prolina: CCC, CCG

13.2 Să presupunem că am introdus un copolimer (ACACA-CAC...) într - un sistem de sinteză proteică liberă . Există două posibilități pentru stabilirea cadrului de citire: ACA dacă începem de la prima bază și CAC dacă începem de la a doua bază. Aceste triplete ar codifica doi aminoacizi diferiți (ACA = treonină; CAC = histidină) și ar produce polipeptide repetitive care alternează între *thr-his-thr-his* ... sau *his-thr-his-thr...*

codului triplet , odată ce o secvență de trinucleotide este inițiată , aceasta va rămâne în aceeași fază de citire și va produce același cod pe tot parcursul secvenței , indiferent de locul de inițiere.

Având în vedere secvența QUACKQUACKQUAC, rețineți că diferite faze de citire produc trei secvențe distincte , fiecare conținând același aminoacid.

Codoni:	CUA	CUA	CUA	CUA.
Aminoacizi:	leu	leu	leu	leu...
	Controlul tyr	Controlul tyr	Controlul tyr	Controlul unic tyr...
	ACU prin	ACU prin	ACU prin	ACU. prin...

Dacă se utilizează un tetranucleotid, cum ar fi ACGUACGUACGU...

Codoni:	ACG	Control	GUA	Unitatea	ACG
Aminoacizi:	prin	tyr	zid	arg	prin
	Unitate a	ACG	Control ul	GUA	Unitate a
	arg	prin	tyr	zid	arg
	GUA	Unitatea	ACG	Controlu	GUA
	zid	arg	prin	tyr	zid
	Control ul	GUA	Unitatea	ACG	Control ul
	tyr	zid	arg	prin	tyr

Rețineți că secvențele sunt aceleași, cu excepția faptului că aminoacidul inițial se schimbă.

13.3 Aplicați bazele suplimentare, înlocuind T cu U:

(a) Secvența 1: 3'-GAAAAAACGGUA-5' Secvența 2: 3'-UGUAGUUAUUGA-5' Secvența 3: 3'-AUGUUCCCCAAGA-5'

(b) Secvența 1: *meta-ala-lys-fys*
Secvența 2: ser-tyr- (terminare)
Secvența 3: *arg-thr-leu-val*

(c) Aplicați instrucțiunile suplimentare:

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

3'-GAAAAAACGGTA-5'

2. La eucariote, sinteza proteinelor are loc în principal în citoplasmă, departe de locația ADN -ului și a informațiilor sale codificate. În plus, în timp ce unii aminoacizi bazici se pot asocia direct cu ADN-ul, aminoacizii acizi nu pot. Prin urmare , a fost necesar un fel de sistem „adaptor" al ADN-ului pentru a dirija asamblarea aminoacizilor.

4. Secvența de tetranucleotide UUACUUACUUAC va produce următoarele triplete în funcție de punctul de plecare: UUA = leu; UAC = tyr; ACU = thr; CUU = leu. Rețineți că, deoarece codul este degenerat, există doi codoni care corespund leucinei .

Secvența de tetranucleotide UAUCUAUCUAUC va produce următoarele triplete în funcție de punctul de inițiere : UAU = tyr; AUC = ileu ; UCU = ser; CUA = leu. Rețineți că, în acest caz, degenerarea nu se manifestă și toți codonii produc aminoacizi diferiți.

6. Deoarece AGG este arg, atunci informațiile din copolimerul AG indică faptul că AGA codifică și arg , iar GAG trebuie, prin urmare, să codifice glu. Combinând aceste informații cu cele din copolimerul AAG, GAA trebuie să codifice și glu, iar AAG trebuie să codifice lys.

8. Substituții originale

treonină ----------> *alanină*

10. Polinucleotidul fosforilaza funcționează în general prin degradarea ARN-ului; cu toate acestea, într -un mediu *in vitro* , cu concentrații mari de ribonucleozidi difosfați, direcția reacției poate fi forțată spre polimerizare . *In vivo,* Concentrația de difosfați ribonucleozidici este scăzută , iar procesul de degradare este favorizat.

_AC(U,C,A, o G) *glicina* ----------> _GG(U o C) *isoleucina* ----------> _AU(U, C o A)

_GC(U,C,A, o G) *serina* _AG(U o C) *valina* _GU(U, C o A)

12. Aplicând dicționarul de codare , următoarele secvențe sunt „decodificate":

Secvența I: met-pro-asp-tyr-ser-(termen)
Secvența 2: met-pro-asp-(termen)

A douăsprezecea bază (un uracil) este deletă din Secvența 1, provocând astfel o mutație de schimbare de fază, care introduce un triplet de terminare UAA .

16. Numărul de codoni pentru fiecare aminoacid specific (sinonimele) este direct legat de frecvența de încorporare a aminoacizilor indicată în problemă.

18. În primul rând , ADN-ul , materialul genetic, este localizat în nucleul unei

14.

G	G	A	giy	G	G	U	gly
U	G	A	term	G	G	C	giy
C	G	A	arg	G	G	A	gly
A	G	A	arg	G	G	G	gly
G	U	A	val	U	G	U	cys
G	C	A	ala		C	G	U arg
G	A	A	glu		A	G	U ser
G	G	U	giy	G	U	U	val
G	G	C	gly	G	C	U	ala
G	G	A	giy		G	A	U asp

celule eucariote, în timp ce sinteza proteinelor are loc în citoplasmă. Prin urmare , ADN-ul nu participă direct la sinteza proteinelor . În al doilea rând , ARN-ul, care este similar din punct de vedere chimic cu ADN-ul, este sintetizat în nucleul celulelor eucariote. O porțiune semnificativă de ARN migrează în citoplasmă, unde are loc sinteza proteinelor. În al treilea rând , există în general o corelație directă între cantitatea de ARN și proteină dintr -o celulă. În plus, au fost obținute dovezi mai directe din experimente care demonstrează că sinteza proteinelor implică un tip diferit de ARN față de cel găsit în ribozomi; la scurt timp după infecția cu fagi, se produce un tip de ARN complementar ADN -ului fagic .

20. Ribonucleozid trifosfații și o matriță ADN, în prezența ARN polimerazei și a unui cation divalent (Mg^{2+}), produc un polimer de ribonucleozid monofosfat, ADN și pirofosfat (difosfat). Se formează cantități echimolare de ribonucleozid trifosfați precursori și ribonucleozid monofosfați și pirofosfați (difosfați) produși. În *E. coli,* transcripția și traducerea pot avea loc simultan . Ribozomii sunt adăugați la capătul 5' al ARNm nascent și migrează spre capătul 3' în timpul traducerii.

22. Produsul imediat al transcripției unui ARN destinat să devină ARNm implică adesea modificarea capătului 5' , la care se adaugă un capac de 7-metilguanozină . În plus, un fragment de până la 250 de reziduuri de acid adenilic este de obicei adăugat la capătul 3', după ștergerea unei secvențe AAUAAA . Marea majoritate a pre-ARNm eucariote conțin

, de asemenea, secvențe intermediare care sunt eliminate, adesea în diverse combinații, în timpul procesului de maturare. La unele organisme, editarea ARN-ului are loc într-unul din două moduri: editarea prin substituție, în care nucleotidele sunt modificate, și editarea prin inserție/ștergere, care modifică numărul total de baze.

Exemplu de locație de procesare

capăt 5' - adăugarea a 7 mG
capăt 3' - adiție poli-A
ștergerea secvenței interne

intern
-editarea ARN -substituție -
inserție/ștergere

24. Editarea prin substituție are loc atunci când bazele nucleotidice individuale sunt modificate. Este foarte frecventă în ARN-urile mitocondriale și cloroplastice, precum și în unele ARN-uri eucariote de origine nucleară. Apolipoproteina B există în forme scurte și lungi, chiar dacă o singură genă codifică ambele. Transcrierea inițială este editată, generând un codon stop care termină polipeptida aproximativ la jumătatea lungimii sale. Cealaltă categorie este editarea prin inserție/ștergere. Parazitul care provoacă boala somnului folosește editarea prin inserție/ștergere a ARN-ului său mitocondrial pentru a forma codonul de start , care plasează apoi restul secvenței în cadrul de citire corespunzător.

26. (a) Primele două baze ale tripletului sunt comune mai multor codoni decât ultima bază. Dacă s-au folosit mai puțini aminoacizi cu mult timp în urmă , probabil că primele două baze au fost cele folosite.

(b) Interesant este că toți aminoacizii enumerați ca primitivi folosesc guanina ca primă bază în fiecare codon. Prin urmare, putem presupune că configurația GNN a fost punctul de plecare al codului care există astăzi. În formatul GNN, a doua bază este utilizată pentru a distinge între aminoacizii enumerați ca primitivi.

(c) Este interesant de observat că aminoacizii considerați cei mai primitivi au o codificare GNN, în timp ce aminoacizii care apar ulterior au o codificare U (U,A,G)(U,C). Se pare că un anumit fenomen ar putea explica diferențele de structură a codonilor dintre aminoacizii primitivi și cei mai recenți. Este probabil ca adăugarea de noi aminoacizi la câmpul de codoni să fi fost un proces lent și predispus la mutații. Adăugarea aminoacizilor care apar ulterior a înlocuit alte atribuiri de codoni anterioare sau unii dintre aminoacizii care apar ulterior au putut utiliza codoni care inițial nu codificau niciun aminoacid? Dacă da, atribuirile de codoni disponibile pentru aminoacizii care apar ulterior ar fi mai puține și mai restricționate. Rețineți că toți aminoacizii care apar ulterior au același nucleotid de început ca și codonii stop actuali . Este posibil ca ceea ce erau anterior codoni stop să fie utilizați acum pentru aminoacizii introduși mai recent , deoarece acest lucru ar perturba mai puțin sinteza proteinelor decât schimbarea atribuirilor de codoni la introducerea de noi aminoacizi? Rămân multe de descoperit cu privire la structura codului genetic .

28. (a) 1 : *mutație fără sens*
2: *Mutație inversă*
3: *mutație de schimbare de fază*

(b) 1: mutație în a treia poziție la A sau G
2: Schimbați U în C în al treilea triplet
3: eliminarea unui G din tripletul UGG (trp)

(c) Terminare

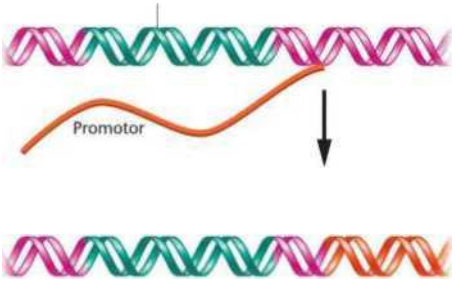
(d) Tripleți specifici pot fi atribuiți tuturor aminoacizilor , inclusiv celei de -a treia baze a fiecărui triplet. Comparați secvențele pentru tipul sălbatic și mutantul 2. După ștergerea unui G din tripletul UUG al triptofanului, mutația de schimbare de fază deplasează prima bază a următorului triplet în a treia bază (adesea ambiguă) a tripletului precedent. Singura soluție puțin mai complicată este cu serina , care are șase tripleți posibili , dar poate fi totuși rezolvată.

AUG UGG UAU CGU GGU AGU CCA ACA

(e) Mutația poate fi la nivelul unui promotor sau al unui amplificator , deși sunt posibile multe modificări post-transcripționale. În funcție de genă și de organism, mutația poate fi la nivelul unui situs de scindare a intronului/exonului etc.

30. Luați în considerare următoarea diagramă , care reprezintă posibilitatea descrisă în problemă. Dacă promotorul nu este transcris , așa cum este de obicei cazul în genele tipice care codifică proteine , retrotranspoziția va produce un *Alu*. O „fiică" căreia îi lipsește un promotor . Un astfel de *Alu* ar fi un „fundătură ", deoarece nu ar fi capabil să genereze propriile secvențe Alu . Poate o secvență *Alu* Introdusă într-o formă 3' într- un promotor ar produce fiice, dar cu siguranță ar fi rar.

Promotor



32. Avantajul ar fi că, dacă se pot identifica omologii de secvență pentru diverse probe de HIV , atunci poate s-ar putea dezvolta un vaccin, sau câteva vaccinuri, pentru multitudinea de subtipuri care infectează diferite părți ale lumii. Cu alte cuvinte, cu cât un vaccin corespunde mai multor tipuri de infecții , cu atât este mai probabil să fie eficient .

Pe de altă parte, cu cât un vaccin este mai specific pentru o anumită țintă , cu atât este mai probabil ca alte variante noi sau nedescoperite anterior să scape eforturilor de vaccinare.

Capitolul 14

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

14.1 Putem concluziona că aminoacidul nu este implicat în recunoașterea codonilor .

14 2 ----------

trp-8 trp-2 *trp-3 trp-1*

Precursor --- * AA ----------* IGP --------- -*■ I ----- * TRY

14.3 Deoarece codonii valinei sunt GUU, GUC, GUA și GUG, modificările la o singură bază din codonii GAA și GAG ai acidului glutamic ar putea duce la substituția gluvală. Acidul glutamic normal este un aminoacid încărcat negativ , în timp ce valina nu are sarcină netă, iar lizina este încărcată pozitiv. Având în vedere aceste modificări semnificative de sarcină, se poate prezice o oarecare influență, sau chiar considerabilă, asupra structurii și funcției proteinei . Astfel de modificări ar putea rezulta din modificări interne în plierea proteinelor sau din interacțiunile cu alte molecule din globulele roșii (RBC) , în special cu alte molecule de hemoglobină.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Un poliribosom funcțional va conține următoarele componente: ARNm, ARNt încărcat, subunități ribozomale mari și mici, factori de elongație și posibil factori de inițiere, peptidil transferază, GTP, Mg*', proteine nascente și posibil factori de eliberare dependenți de GTP .

4. S-a argumentat că nu ar exista suficientă afinitate între aminoacizi și acizii nucleici pentru a explica sinteza proteinelor. De exemplu, aminoacizii acizi nu ar fi atrași de acizii nucleici. Cu o moleculă adaptor, s-ar putea crea legături de hidrogen specifice între acizii nucleici , precum și legături covalente specifice între un aminoacid și ARNt-ul unui acid nucleic.

6. Deoarece există trei nucleotide care codifică fiecare aminoacid , vor exista 423 de litere de cod (nucleotide), 426 dacă includem un codon stop . Aceasta presupune că alte componente, cum ar fi coada poli-A, capacul *5′ și* secvențele de început necodificatoare , sunt omise .

8. În prezența ATP, Mg* * și a unei aminoacil sintetază specifice , un aminoacid produce un complex enzimatic aminoacid-AMP (+ PP) . Acest complex interacționează cu un ARNt specific pentru a produce aminoacil ARNt.

10. ARNt-urile izoacceptoare sunt cele care recunosc și acceptă un singur tip de aminoacid. Într-un fel, fiecare dintre cele 20 de aminoacil ARNt sintetaze diferite trebuie să fie capabilă să recunoască compoziția bazelor și/sau structura terțiară a fiecăruia dintre grupările ARNt - izoacceptoare . În caz contrar , fidelitatea traducerii ar fi grav compromisă. Cea mai directă soluție la problemă ar fi ca fiecare sintetază să recunoască fiecare anticodon. O altă ipoteză rezonabilă ar putea implica bucla variabilă, care, împreună cu anticodonul , ar putea permite o astfel de specificitate. În realitate , sunt implicate mai multe caracteristici ale fiecărui ARNt : una sau mai multe dintre bazele anticodonului , părți ale brațului acceptor și o bază specifică care se află în apropierea CCA terminală .

12. Atât fenilalanina , cât și tirozina pot fi obținute din dietă. Majoritatea proteinelor naturale conțin acești aminoacizi.

14. Când o mamă însărcinată reintroduce fenilalanina în dieta sa, ea își expune copilul la niveluri de fenilalanină mai mari decât în mod normal pe tot parcursul dezvoltării sale. Deoarece creșterea fenilalaninei este toxică , mulți nou-născuți (aproximativ 90 %) sunt afectați grav și ireversibil de dizabilitate intelectuală la naștere . Mamele însărcinate (care sunt predispuse genetic la fenilcetonurie) trebuie să revină la o dietă săracă în fenilalanină în timpul sarcinii.

16. *thi-2*

Precursor ---- ► Pirimidină ,. , *thi-3*

thj. 1 ----- ^ *sunt * na*

Precursorul ---- Tlazol

18. Mobilitatea electroforetică a unei proteine se bazează pe mai mulți factori , în principal sarcina netă a proteinei și , într - o oarecare măsură, conformația sa în mediul electroforetic . Ambii factori se bazează pe tipul și secvența (structura primară) aminoacizilor care alcătuiesc proteina. Interacțiunile (legăturile de hidrogen) dintre componentele legăturilor peptidice și interacțiunile hidrofobe, hidrofile și covalente (precum și altele) depind toate de secvența originală de aminoacizi și joacă un rol în determinarea conformației finale a unei proteine. Prin urmare, o modificare a mobilității electroforetice a unei proteine ar indica faptul că secvența de aminoacizi s - a modificat.

20. Anemia falciformă este denumită o boală *moleculară* deoarece este destul de bine înțeleasă la nivel molecular; există o modificare fundamentală a ADN-ului care duce la o modificare a aminoacizilor din lanț *(3* de hemoglobină. Este , de asemenea, o *boală genetică,* în sensul că este moștenită din generație în generație. Nu este contagioasă, așa cum ar putea fi cazul unei boli cauzate de un microorganism . Bolile cauzate de microorganisme nu urmează neapărat linii familiale, în timp ce bolile genetice o fac .

22. Este posibil ca un aminoacid să se modifice fără a altera mobilitatea electroforetică a unei proteine în condiții standard . Dacă aminoacidul este substituit cu altul cu sarcină și structură similare, există o anumită probabilitate ca factorii care influențează mobilitatea electroforetică (în principal sarcina netă) să nu fie afectați. Alte tehnici, cum ar fi cromatografia cu peptide digerate , pot detecta diferențe subtile între aminoacizi.

24. Toate substituțiile implică o schimbare de bază.

26. Termenul coliniaritate se referă la aranjamentul secvențial al subunităților de aminoacizi și baze azotate din proteine și respectiv ADN. Secvențierea genelor și a produselor acestora în fagul MS2 și studiile mutațiilor din subunitatea A a genei *nonsintetazei triptofage* indică existența unei relații coliniare.

28. *Primar:* aranjamentul sau secvența liniară de aminoacizi . Această secvență determină structurile de nivel superior.

Secundar: structuri alfa helix și foi plisate generate de legături de hidrogen formate între componentele legăturii peptidice.

Pliere terțiară: pliere care apare ca urmare a interacțiunilor dintre lanțurile laterale de aminoacizi. Aceste interacțiuni includ, printre altele, următoarele: legături disulfidice covalente între reziduurile de cisteină, interacțiunile lanțurilor laterale hidrofile cu apa și interacțiunile reciproce dintre lanțurile laterale hidrofobe.

Cuaternar: asocierea a două (dimeri) sau mai multe lanțuri peptidice lipidice. Numite *proteine oligotene,* aceste proteine sunt formate din mai multe lanțuri proteice.

30. Enzimele au rolul de a regla activitățile catabolice și anabolice ale celulelor. Acestea influențează (scad) *energia de activare,* permițând reacțiilor chimice să se desfășoare în condiții compatibile cu sistemele biologice. Enzimele posedă situsuri active și/sau alte domenii sensibile la mediu. Situsul activ este considerat a fi o fantă sau o depresiune care leagă reactanții, crescând astfel reacția acestora. Celelalte domenii menționate pot influența conformația și, prin urmare, funcția situsului activ.

32. Chiar dacă sunt implicate trei perechi de gene, rețineți că, datorită modelului mutațiilor, fiecare încrucișare poate fi tratată fie ca un monohibrid (a), fie ca un dihibrid (b, c).

(a) *Pt :* *AABbCC* = pătat
F 2 :3 *AAB_CC* - moteada
1 *AAbbCC* = galben

(b) *P 1 :AABbCc* — moteada
F 2 :9 *AAB_C_* — moteada
3 *AAB_cc* — verde
3 *AAbbC-* = galben
1 *AAbbcc* = galben

(c) *Pf.AaBBCc* =moteada
F 2 : 9 *A_BBC_* = moteada
3 *A_BBcc* =verde
3 *aaBBC-* = fără culoare
1 *aaBBcc* = fără culoare

34. O cruce de următoarea natură ar fi în concordanță cu datele:

AABBCC X *aabbcc*

Descendenți din generația F2 :

27 *A_B_C_* = violet
9 *A_B_cc* = trandafir
9 *A_bbC_* = roz
9 *aaB_C_* = portocaliu
3 *A_bbcc* = roz
3 *aaB_cc* = roz
3 *aabbC-* = roz
1 *aabbcc* = roz

c	*b*	*a*
roz— > roz —> portocaliu — > violet		

Ipoteza de mai sus ar putea fi testată prin efectuarea unei retroîncrucișări precum următoarea :

AaBbCc X *aabbcc*

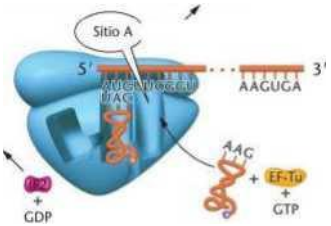
38. (a) Se pare că gena este moștenită ca dominantă, deoarece, pentru a fi recesivă, cei trei indivizi care nu aparțin aceleiași linii de consangvinitate ar fi trebuit să fie heterozigoți , ceea ce este puțin probabil. În plus, o mutație într-o ARNt sintetază ar fi de așteptat să aibă un impact negativ considerabil asupra sintezei proteinelor care conțin glicină .

(b) Pe de altă parte, deoarece indivizii afectați din această genealogie sunt heterozigoți, trebuie să existe suficientă activitate a glicină ARNt sintetazei pentru a susține funcțiile vitale .

(c) Tulburările mutaționale și fiziologice, în special atunci când apar la

El cruce debería dar una proporción
4(rosa):2(rosada):l (naranja):! (púrpura).

36.



începutul dezvoltării , pot provoca neuropatologii . Acest lucru se datorează naturii extrem de sensibile a dezvoltării celulelor nervoase și , probabil , pentru că axonii sunt în mod normal destul de lungi, astfel încât o reducere a sintezei proteinelor care conțin glicină inhibă distribuția largă necesară a acestor proteine în cadrul axonilor.

Capitolul 15

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

I5.I Influența oricărei modificări a bazelor asupra fenotipului depinde de mai mulți factori, inclusiv localizarea sa în regiunile codificatoare și necodificatoare, potențialul său de dominanță sau recesivitate și interacțiunea sa cu alte secvențe de baze din genom . Dacă o modificare a bazelor este localizată într -o regiune necodificatoare, este posibil să nu aibă nicio influență asupra fenotipului. Cu toate acestea , unele regiuni necodificatoare , în sensul tradițional, pot influența alte gene și/sau produse genetice. Dacă o mutație care apare

într-o regiune codificatoare acționează ca o trăsătură recesivă completă, nu ar trebui să existe nicio influență asupra fenotipului. Dacă o genă mutantă acționează ca o trăsătură dominantă, atunci ar exista o influență asupra fenotipului. Unele gene interacționează cu alte gene în moduri care ar fi dificil de prezis fără informații suplimentare.

15.2 Dacă o genă este incomplet penetrantă, ea poate fi prezentă într-o populație și poate fi exprimată doar în anumite condiții. Este puțin probabil ca gena hemofiliei să se fi comportat în acest fel. Dacă expresia unei gene este suprimată de o altă mutație la un individ, este posibil ca urmașii să moștenească o anumită genă și nu supresorul acesteia. Acești urmași ar avea hemofilie. Este posibil ca mutația din familia Reginei Victoria să fi fost nouă, apărând la tatăl ei. În cele din urmă , este posibil ca mama ei să fi fost heterozigotă și ca, din întâmplare, niciun alt individ din familia ei să nu fi avut ghinionul de a primi gena mutantă.

15.3 Orice agent care inhibă replicarea ADN-ului, direct sau indirect, prin -mutație și/sau reticulare a ADN-ului, va suprima ciclul celular și poate fi util în terapia cancerului. Deoarece alchilarea guaninei duce adesea la nepotriviri de baze, acestea pot fi frecvent reparate prin diverse mecanisme de reparare a nepotrivirilor. Cu toate acestea, reticularea ADN-ului poate fi reparată prin mecanisme de recombinare. Prin urmare, pentru ca astfel de agenți să aibă succes în terapia cancerului, supresoarele sistemelor de reparare a ADN-ului sunt adesea utilizate împreună cu anumite medicamente anticancerigene.

15.4 Etil metanosulfonatul (EMS) alchilează grupările ceto din poziția a șasea a guaninei și din poziția a patra a timinei. În fiecare caz, afinitățile de împerechere a bazelor sunt alterate, rezultând mutații de tranziție . Bazele alterate nu sunt ușor de reparat, iar odată ce are loc tranziția la baze normale prin repetare, aceste mutații nu mai pot fi reparate.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Mutațiile sunt „ferestrele" prin care geneticienii examinează funcția normală a genelor, celulelor și organismelor. Atunci când apare o mutație, aceasta permite cercetătorilor să formuleze întrebări despre funcția alelei normale a acelei mutații. La un alt nivel, mutațiile oferă „markeri" cu ajutorul cărora biologii pot studia genetica și dinamica populațiilor.

4. Atunci când se efectuează screening-ul genetic, se presupune că toate celulele dintr-un organism sunt identice genetic. Prin urmare, în timpul screening-ului , organismul permite detectarea mutației. Cu toate acestea, deoarece o mutație somatică apare prima dată într -o singură celulă, este foarte puțin probabil ca organismul să fie suficient de modificat pentru a detecta mutația prin screening , deoarece niciuna dintre celelalte celule din organismul respectiv nu va avea aceeași mutație .

6. O genă este probabil produsul a aproximativ un miliard de ani de evoluție. Fiecare genă și produsul său funcționează într- un mediu care a evoluat, de asemenea , sau , mai degrabă , a co -evoluat. Pentru ca viața să existe, este necesară o acțiune coordonată a tuturor produselor genetice . Abaterile de la normă , cauzate de mutații , tind să fie dăunătoare din cauza mediului complex și interactiv în care trebuie să funcționeze fiecare produs genetic. Cu toate acestea , ocazional apar variații benefice .

8. O mutație *condiționată* Este unul care produce un fenotip de tip sălbatic într -o anumită condiție de mediu și un fenotip mutant în condiții diferite. Un *fenotip letal* O genă condiționată este una care, în anumite condiții de mediu, duce la moartea prematură a organismului.

10. Toți cei trei agenți sunt mutageni deoarece provoacă substituții de baze . Agenții de dezaminizare deaminează oxidativ bazele , astfel încât citozina este convertită în uracil și adenina în hipoxantină . Uracilul se împerechează cu adenina , iar hipoxantina se împerechează cu citozina. Agenții de alchilare donează o grupare alchil grupărilor amino sau ceto ale nucleotidelor, modificând astfel afinitățile de împerechere a bazelor . 6 -Etilguanina acționează ca adenină , prin urmare, se împerechează cu timina. Analogii de baze , cum ar fi 5 -bromouracilul și 2- aminopurina, sunt încorporați ca timină și , respectiv , adenină , dar formează perechi de baze cu guanina și, respectiv , citozina .

12. Razele X au o energie mai mare și o lungime de undă mai scurtă decât lumina UV . Au o putere de penetrare mai mare și pot afecta ADN-ul într- o măsură mai mare .

14. Fotoreactivarea poate duce la repararea *daunelor* induse de UV . O enzimă, enzima de fotoreactivare , absoarbe un foton de lumină pentru a scinda dimerii de timină. *Repararea prin excizie* implică produsele mai multor gene, ADN polimeraza I și ADN ligaza pentru a tăia dimerul indus de UV , a umple golul rezultat și a se uni la catena fosfodiesterilor . Procesul de reparare prin excizie poate fi activat de deteriorarea care distorsionează helixul ADN-ului .

Reparația *recombinațională* Este un sistem care răspunde la ADN-ul care a scăpat de alte mecanisme de reparare în timpul replicării . Dacă se creează un gol într -una dintre catenele nou sintetizate, o „ operațiune de salvare " sau „răspuns SOS " permite umplerea golului. Există multe produse genetice diferite implicate în acest proces de reparare : *ree* A și *lexA*. În repararea SOS , detectarea erorilor de către ADN polimeraza III este suprimată, așa că acest sistem este considerat „predispus la erori".

16. Există numeroase regiuni în amonte de regiunile codificatoare dintr-o genă care sunt sensibile la mutații . Multe mutații perturbă regiunile care semnalizează factorii de transcripție și/sau legarea polimerazei , influențând astfel transcripția. Mutațiile din introni pot afecta splicing-ul intronic sau alți factori care determină stabilitatea sau translația ARNm .

18. *Xeroderma pigmentosum* Este o formă de cancer de piele la om, posibil cauzată de mai multe gene autozomale rare

care interferează cu repararea ADN-ului deteriorat . Studiile efectuate pe heterocariote oferă dovezi ale complementării, indicând faptul că pot fi implicate până la șapte gene diferite. Enzima de reparare prin fotoreactivare pare, de asemenea, să fie implicată . Deoarece cancerul este cauzat de mutații în diferite tipuri de gene , interferența cu repararea ADN-ului poate crește rata de apariție a acestor tipuri de mutații.

20. Este posibil ca ratele de mutație să scadă datorită reducerii anumitor agenți de mediu care cauzează mutații. Pe de altă parte, anumite activități industriale și medicale concentrează mutageni (agenți radioactivi și substanțe chimice periculoase). Dacă populațiile umane nu se protejează de astfel de agenți, ratele de mutație ar putea crește. Dacă luăm în considerare acumularea de mutații (nu ratele) în populația umană ca urmare a îmbunătățirii condițiilor de viață și a îngrijirii medicale , atunci este probabil ca, pe măsură ce mediul devine mai puțin dur (datorită acestor îmbunătățiri), să fie tolerate mai multe mutații , deoarece presiunea selectivă este redusă. În plus, pe măsură ce oamenii trăiesc mai mult și au copii la o vârstă mai înaintată, unele studii indică faptul că bărbații mai în vârstă acumulează mai multe mutații gametice.

22. Transpozonii provoacă modificări ale ADN-ului în diverse moduri, inclusiv modificări cromozomiale masive. În majoritatea cazurilor, aceste modificări ale ADN-ului sunt dăunătoare organismelor, în timp ce în cazuri rare pot conferi un avantaj evolutiv , deoarece noua variație genetică oferă un avantaj selectiv .

24. *XP1 XP4 XP5*
XP2 *XP6*
XP3 *XP7*
Clusterele (grupurile de complementare) indică faptul că sunt necesare cel puțin trei produse genetice pentru sinteza neprogramată a ADN-ului . Toate liniile celulare aparținând aceluiași grup de complementare sunt defecte în ceea ce privește acel produs.

26. Aproximativ 78 % din expunerea umană la radiații provine din surse naturale . Deși razele X pentru diagnostic contribuie cu aproximativ 10 % la această rată de expunere , alte forme de radiații cauzate de om contribuie doar cu un procent mic . Aceasta nu înseamnă că expunerea la radiații cauzate de om nu este un factor în provocarea mutațiilor; pur și simplu nu este un factor major .

28. Deoarece betazoizii au un cod genetic de patru litere, iar gena are 3.332 de nucleotide , proteina implicată trebuie să aibă 833 de aminoacizi.

Codonul 829 specifică un aminoacid foarte aproape de capătul carboxil al genei. Deși o mutație nonsens ar cauza terminarea prematură a traducerii, proteina ar fi scurtată doar cu cinci aminoacizi . Prin urmare, capacitatea proteinei de a se plia și de a-și îndeplini funcția celulară nu ar fi afectată serios. Datorită direcției de traducere (5' către 3' în ARNm), aminoacizii de la capătul carboxil al unei proteine sunt ultimii incluși în prioritățile de pliere și uneori sunt cei mai puțin semnificativi în determinarea funcției proteinei.

(lrn-2) Întrucât fenotipul reprezintă o tulburare ușoară, această modificare a aminoacizilor nu inactivează complet proteina, deși îi modifică activitatea într- o oarecare măsură . Este posibil ca substituția să determine plierea proteinei într-un mod ușor aberant, permițându-i să păstreze o anumită funcție reziduală, dar împiedicând-o să funcționeze complet normal. În plus, chiar și atunci când proteina se pliază similar cu proteina de tip sălbatic, diferențele structurale sau de sarcină la situsul activ al proteinei pot fi doar ușor afectate.

(lm-3) Această deleție conține un total de 68 de nucleotide, reprezentând 17 aminoacizi. Deoarece codonii betazoizi conțin patru nucleotide, cadrele de citire ale ARNm sunt menținute după deleție. Funcția proteinei depinde semnificativ de pozițiile relative ale nivelurilor structurii secundare: alfa helici *și* alfa foi. Dacă secțiunea deletă acționează ca o punte „benignă” între alte domenii proteice mai semnificative, atunci probabil că proteina poate tolera pierderea unor aminoacizi dintr-o parte a sa fără a-și pierde complet funcția.

(lm-4) Aminoacidul specificat de codonul 192 trebuie să fie esențial pentru funcția proteinei. Alterarea acestui aminoacid trebuie să afecteze o regiune critică a proteinei, determinând-o să-și piardă toată sau cea mai mare parte a activității. Dacă enzima este o proteină, acest aminoacid ar putea fi localizat în situsul său activ și ar putea fi esențial pentru capacitatea enzimei de a se lega de și/sau de a influența substratul său. Modificarea aminoacizilor ar fi de așteptat să fie destul de radicală, cum ar fi cea observată în dezvoltarea anemiei falciforme. HbS este cauzată de substituția unui acid glutamic încărcat negativ cu o valină (fără sarcină netă).

(/m-5) O deleție de 11 perechi de baze, un număr care nu este divizibil cu patru, va determina deplasarea cadrului de citire după această poziție. Deși această deleție este mai mică decât cea discutată anterior (83-150) și este localizată în aceeași regiune, ea provoacă totuși o deplasare a cadrului de citire. În plus, unii sau toți aminoacizii adăugați în aval de mutație pot diferi de cei din proteina normală. Este probabil ca nu toți să se modifice din cauza sinonimiei din codul genetic. Există, de asemenea, posibilitatea ca un triplet nonsens să fie introdus în regiunea „defazată”, provocând astfel terminarea prematură a lanțului. Deoarece această mutație apare doar într-o singură parte a genei, cea mai mare parte a proteinei va fi afectată. Acest lucru poate explica pe deplin fenotipul de insensibilitate severă.

30. Este probabil ca IS să fi ocupat sau să fi perturbat funcționarea normală a unei regiuni controlor legate de

genele *galactozei* , care sunt situate într-un operon cu un element controlor în amonte.

32. Mutație nonsens în regiunile codificatoare: produs scurtat la puțin mai puțin de 375 de aminoacizi, în funcție de locul în care are loc terminarea lanțului. Inserție în Exonul 1 , provocând o schimbare de fază: diverse substituții de aminoacizi și posibilă terminare a lanțului în aval . Inserție în Exonul 7, provocând o deplasare a cadrului de citire: diverse substituții de aminoacizi și posibilă terminare a lanțului în aval, afectând o porțiune mai mică a proteinei decât inserția în Exonul 1. Mutație missense : substituția unui aminoacid. Deleție în Exonul 2, provocând o deplasare a cadrului de citire: în funcție de dimensiunea deleției , pot lipsi prea mulți aminoacizi . Deplasarea cadrului de citire ar provoca modificări suplimentare ale aminoacizilor și posibilă terminare. Deleție în Exonul 2, fără o deplasare a cadrului de citire: aminoacizii vor lipsi în Exonul 2, fără modificări suplimentare ale proteinei. Deleție mare care acoperă exonii 2 și 3: pierdere semnificativă de aminoacizi către partea N-terminală a proteinei .

Capitolul 16

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

16.1 (a) Datorită deleției unei baze din regiunea inițială a *genei lacZ,* va exista o deplasare a cadrului de citire pentru toate citirile în aval de deleție , alterând astfel numeroși aminoacizi. Terminarea prematură a traducerii lanțului este destul de probabilă (datorită introducerii unui triplet nonsens într-unul dintre cadrele de citire) sau terminarea normală a lanțului poate fi ignorată . În ambele cazuri, gena *Z* este probabil să se afle într-o stare mutantă. Dacă o astfel de celulă este plasată într-un mediu lactozat, aceasta nu va putea crește deoarece β-3-galactozidaza nu va fi disponibilă. (b) Dacă deleția are loc în regiunea inițială a genei A, produsul genei A ar fi de așteptat să fie afectat , dar nu va influența utilizarea lactozei ca sursă de carbon.

16.2 (a) Fără lactoză și fără glucoză, operonul este dezactivat, deoarece represorul *lac* este legat de operator și chiar dacă CAP este legat de situsul său corespunzător, acesta nu va anula acțiunea represorului.

(b) Adăugarea de lactoză în mediu inactivează represorul *lac* , permițând operonului să transcrie genele structurale. Fără glucoză, CAP rămâne legat de situsul său corespunzător, îmbunătățind astfel transcripția.

(c) Fără lactoză în mediu, represorul *lac* este legat de regiunea operatorului, iar deoarece glucoza inhibă adenilat ciclaza, proteina CAP nu va interacționa cu situsul său de legare. Prin urmare, operonul va fi dezactivat.

(d) În prezența lactozei, represorul *lac* va fi inactivat; totuși, deoarece este prezentă și glucoza, CAP nu va interacționa cu situsul său de legare. În aceste condiții, transcripția va fi mult redusă, iar operonul poate fi considerat dezactivat.

16.3 (a) Deoarece triptofanul este din abundență, se presupune că ARNt încărcat [trp va fi, de asemenea] , prezent. TRAP ar trebui să fie saturat cu triptofan și legat activ de capătul 5' al ARNm-ului nascent. Prin urmare, genele structurale nu ar trebui să fie exprimate. Gena *AT* nu este indusă.

(b) Dacă triptofanul este insuficient, chiar dacă ARNr este prezent · [acesta] nu va fi încărcat. TRAP va fi prezent, dar nu va fi saturat cu triptofan. Genele structurale ar trebui să fie exprimate . ARNr neîncărcat duce [la] inducerea genei AT .

(c) Răspunsul la această situație necesită clarificări . Dacă triptofanul [este] abundent , dar ARNt-ul [trp] este rar, presupunerea este că ARNt-ul rp ARNt-ul încărcat va fi, de asemenea, rar. Acest lucru se poate datora unei triptofanil - ARNt sintetază nefuncționale . În acest caz, ARNt-ul [trp] TRAP neîncărcat poate induce *AT,* care apoi se leagă de TRAP saturat cu triptofan . Acest lucru împiedică legarea TRAP de secvența de ARN lider , permițând astfel exprimarea operonului triptofan .

(d) Fără TRAP, transcripția nu poate fi terminată . Prin urmare, în *aceste* condiții , chiar și cu triptofan abundent, va avea loc expresia operonului . Gena AT Nu va fi indusă, deoarece se presupune că atunci când triptofanul este abundent, ARNt · [rp] Încărcătură va fi, de asemenea, abundentă.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Enzimele operonului lactoză sunt necesare pentru descompunerea și utilizarea lactozei ca sursă de energie. Dacă lactoza este singura sursă de carbon , enzimele necesare pentru utilizarea acestei surse de carbon sunt sintetizate. Dacă lactoza nu este prezentă, nu este „nevoie” de aceste enzime. Operonul triptofan conține gene structurale pentru *sinteză* . de triptofan . Dacă există puțin sau deloc triptofan în mediu, operonul triptofanului este activat pentru a produce triptofan. Dacă triptofanul este abundent în mediu, atunci nu este „nevoie” ca operonul să producă sintaze de triptofan.

4. Într-un *sistem inductibil,* represorul care în mod normal interacționează cu operatorul pentru a preveni transcripția este inactivat de un *inductor,* permițând astfel transcripția. Într -un *sistem represibil,* un *represor* în mod normal inactiv este *activat* de către un *corepresor,* permițând astfel represorului activat să se lege de operator și să inhibe transcripția. Deoarece interacțiunea proteinei (represorului) influențează transcripția, sistemele descrise aici sunt forme de *control negativ.*

6. */*O*Z** — Datorită funcției represorului activ al genei /* și fără lactoză care să îi influențeze funcția, enzima nu va fi produsă .

O enzimă funcțională va fi produsă deoarece operatorul constitutiv este în [cis] *față* de gena Z. Lactoza din mediu nu ar avea nicio influență deoarece operatorul este constitutiv . *Represorul* nu se poate lega de operatorul mutant.

/ O ' Z = Se va produce o enzimă nefuncțională, deoarece cu *1* sistemul este constitutiv, dar gena Z este mutantă. Absența lactozei în mediu nu ar avea nicio influență deoarece represorul este nefuncțional. Represorul mutant nu se poate lega de operator .

I'O'Z = Se va produce o enzimă nefuncțională deoarece cu *I* sistemul este constitutiv, dar gena *Z* este mutantă. Lactoza din mediu nu ar avea nicio influență deoarece represorul este nefuncțional. Represorul mutant nu se poate lega de operator.

IOZ /FT = Nu se va produce nicio enzimă, deoarece în absența lactozei produsul represor al genei / ' se va lega de operator și va inhiba transcripția.

FO'Z ⁺ */F'O* ⁺ = Deoarece există un operator *cis* constitutiv cu gena *Z* normală , se va produce o enzimă funcțională. Lactoza din mediu nu va avea nicio influență deoarece operatorul este mutant.

/ ⁺ *O* ⁺ *Z~/F' r O* Z** Deoarece lactoza este prezentă în mediu, proteina represor nu se va lega de operator și va avea loc transcripția. Prezența unei gene *Z* normale va permite producerea atât a enzimelor funcționale, cât și a celor nefuncționale. Proteina represor este difuzibilă și acționează în *regiunea trans.*

rO ⁺ *Z~/F' 1*0* Z* ⁺ — *Ca* Dacă nu există lactoză în mediu, proteina represor (a lui */**) va reprima operatorul și nu se va produce nicio enzimă.

I ˢ *O* ⁺ *Z* ⁺ */F'O* ⁺ = Odată cu produsul lui *F* , represorul se leagă de operator și, prin urmare, nu se va produce nicio enzimă. Absența lactozei în mediu nu are nicio consecință deoarece represorul mutant este insensibil la aceasta.

*/** (TZ ⁺ */F'O* ⁺ *Z* ⁺ = Poziția operatorului constitutiv (O ᶜ) împreună cu gena Z va determina producerea enzimei funcționale .

8. O singură celulă *de E. coli conține foarte puține* molecule represoare *lac* . Cu toate acestea , mutația *lac F'* provoacă o creștere de 10 ori a producției proteinei represoare, facilitând izolarea acesteia. Folosind dializa împotriva unui inductor radioactiv liber (IPTG), Gilbert și Muller-Hill au reușit să identifice proteina represoare în extracte selectate de celule *lac F.* Materialul marcat cu IPTG a fost purificat și s-a dovedit a fi sensibil la temperatură și a avea alte caracteristici asemănătoare proteinelor . Extracte de celule *lac* I Acestea nu se alătură IPTG- ului marcat.
10. (a) Întrucât CAP activat este o componentă a legării cooperative a ARN polimerazei la *promotorul lac,* absența unei *crp* funcționale ar pune în pericol controlul pozitiv demonstrat de CAP.
    (b) Fără un situs de legare CAP ar exista o reducere a inductibilității operonului *lac.*
12. Atenuarea are rolul de a reduce sinteza triptofanului atunci când aportul este suficient. Aceasta se realizează prin reducerea transcripției *operonului triptofan.* Același fenomen se observă atunci când triptofanul activează represorul pentru a dezactiva transcripția acestui operon.
14. Neelaredoxina pare a fi o proteină care apără organismele anaerobe și, probabil, și pe cele aerobe, de stresul oxidativ cauzat de metabolismul oxigenului. Generarea de radicali liberi de oxigen (care generează stres oxidativ) depinde de diverse specii moleculare, inclusiv O_2 și H_2O_2 . Se pare că în permanență se produc niveluri relativ ridicate de neelaredoxină (este *exprimată constitutiv).* chiar și atunci când nu se adaugă în sistem inductori potențiali ai expresiei genelor . Tratamentul cu O2 și H2O2 nu provoacă o expresie suplimentară a neelaredoxinei *(inducție)* .
16. Când mediul conține arabinoză, genele structurale ale operonului arabinoză sunt transcrise . Dacă genele structurale ale operonului *ara ar fi înlocuite* cu genele structurale ale operonului lac , atunci în prezența arabinozei, genele structurale *lac* ar fi transcrise și β3-galactozidaza ar fi produsă la niveluri induse.
18. Întrucât un represor oprește transcripția, am tinde să considerăm acest sistem, așa cum este descris aici, ca fiind sub control negativ.
20. Sistemul este *inductibil. C* codifică gena structurală. B trebuie să fie promotorul. Locusul A este operatorul , iar locusul *D este* Este gena represoare .
22. Primele două propoziții ale problemei indică un sistem inductibil în care uleiul stimulează producerea unei proteine, care la rândul său activează (control pozitiv) genele pentru a metaboliza uleiul . Rezultatele diferite din tulpinile 2 și 4 sugerează un sistem cis-acțiune . Deoarece operonul în sine (ca și în cazul mutantului din tulpina 3) asigură sinteza constitutivă a genelor structurale, acest lucru susține, de asemenea, un *sistem cis-acțiune.* Elementul *cis -acțiune* face probabil parte din operon.
24. Dacă am putea dezvolta un test pentru celelalte produse genetice sub control SOS, cu o *tulpină lexA,* celelalte produse genetice ar trebui să fie prezente la niveluri induse.
26. (a) Cel mai simplu model pentru acțiunea R și D la *Chlamydia* ar fi acela de a face elementul represor (R) ineficient în legarea la elementul *cis* (D) în cazul șocului termic. Acest lucru s-ar putea întâmpla în două moduri distincte. Fie ADN-ul superînrăsucit își modifică conformația și devine ineficient în legarea la R, fie eficiența proteinei R în legarea la D este afectată de căldură. În ambele cazuri, genele pentru infectivitate sunt transcrise în prezența șocului termic.
    (b) Cea mai directă comparație între sistemul de șoc termic R și D la *Chlamydia și* factorul de șoc termic sigma la *E. coli ar fi atunci când* sistemul RD este dezactivat la *Chlamydia* și un factor sigma este activat de căldură la E. *coli.*

Capitolul 17

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

17.1 Celulele canceroase apar adesea sub influența mutațiilor în genele supresoare tumorale sau în proto - oncogene. Dacă apare hipermetilarea într-una dintre numeroasele gene de reparare a ADN-ului , rata mutației ar crește deoarece sistemul de reparare a ADN-ului este afectat. Creșterea rezultată a numărului de mutații ar putea apărea în genele supresoare tumorale sau în proto-oncogene

.

17.2 Factorii generali de transcripție se asociază cu un promotor pentru a stimula transcripția unei gene specifice . Unele elemente de acțiune în *trans* Când se leagă de amplificatori, aceștia acționează împreună cu coactivatorii pentru a intensifica transcripția, formând un potențiosom care stimulează inițierea transcripției. Transcripția poate fi reprimată de anumite proteine care se leagă de elementele de ADN care reduc transcripția și generează structuri represive de cromatină. Aceeași moleculă se poate lega de un situs de reglare cromozomial diferit (amplificator sau amortizor), în funcție de mediul molecular al unui anumit tip de țesut.

17.3 Mutațiile genei *ira* la *Drosophila* pot altera considerabil dezvoltarea, rezultând o femelă normală dacă proteina TRA este prezentă, în timp ce se dezvoltă un mascul dacă proteina TRA este absentă. O alelă *tra nulă* ar produce masculi datorită procesului specific masculin de tăiere și îmbinare, în timp ce o genă *tra activă* ar produce femele.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Celulele eucariote conțin cantități mai mari de ADN, iar acest ADN este asociat cu diverse proteine, inclusiv proteine cromozomiale histonice și non-histonice. *Cromatina* ca atare nu există în organismele procariote. În plus, în timp ce organismele procariote au de obicei un singur cromozom, eucariotele au mai mult de unul , toți cromozomii fiind închiși într-o membrană (membrana nucleară). Această membrană nucleară separă procesele de transcripție și traducere atât temporal, cât și spațial, oferind astfel o oportunitate pentru reglarea post-transcripțională și pre-translațională.

   În timp ce organismele procariote răspund genetic la schimbările din mediul lor extern, celulele eucariotelor multicelulare interacționează între ele, precum și cu mediul extern. Diversitatea structurală și funcțională a celulelor unui organism eucariot multicelular, combinată cu faptul că toate celulele unui organism conțin un set complet de gene, sugerează că anumite gene sunt active în unele celule, dar nu și în altele .

   Studierea reglării genelor eucariote este adesea dificilă din cauza complexităților menționate mai sus , în special în ceea ce privește specificitatea țesuturilor și diferitele niveluri la care poate avea loc reglarea. Obținerea unui grup omogen de celule dintr -un organism multicelular necesită de obicei o modificare semnificativă a mediului natural al celulei. Prin urmare, rezultatele studiilor pe celule izolate trebuie interpretate cu prudență. În plus, din cauza varietății componentelor (nucleare și citoplasmatice), este dificil să se izoleze anumite tipuri de molecule fără contaminare. Chiar dacă se realizează o astfel de izolare, este dificil să se interpreteze comportamentul real al acestor molecule într -un mediu artificial.

4. Spunem că cromatina este remodelată atunci când există modificări semnificative în organizarea sa. Această remodelare implică modificări ale metilării ADN-ului și interacțiunea ADN-ului cu histonele din nucleozomi . Complexele de remodelare nucleozomală modifică structura și poziția nucleozomilor conform unei serii de procese, inclusiv modificarea histonei și acțiunea amplificatorilor/silențiatorilor .

6. Când ADN-ul este activ transcripțional, acesta se află într -o stare mai puțin condensată și, prin urmare, este mai deschis digestiei de către DNază .

8. În general, spunem că cromatina este remodelată atunci când există modificări semnificative în organizarea sa . Această remodelare implică modificări ale metilării ADN-ului și interacțiunea ADN-ului cu histonele din nucleozomi . Complexele de remodelare nucleozomală modifică structura și poziția nucleozomilor conform unei serii de procese , inclusiv modificarea histonei .

10. Factorii de transcripție sunt proteine *necesare* pentru inițierea transcripției. Cu toate acestea, acestea nu sunt *suficienți pentru ca* transcripția să înceapă . Pentru a fi activată, ARN polimeraza II necesită o serie de factori de transcripție . Factorii de transcripție conțin cel puțin două domenii funcționale : unul se leagă de secvențele de ADN ale promotorilor și/sau amplificatorilor, în timp ce celălalt interacționează cu ARN polimeraza sau cu alți factori de transcripție. Unii factori de transcripție se leagă de alți factori de transcripție fără a se lega ei înșiși de ADN.

12. În general, putem determina influența diferiților regulatori prin eliminarea elementelor necesare sau prin adăugarea de elemente suplimentare. În plus , examinarea rezultatului mutațiilor în cadrul acestor elemente oferă adesea informații despre funcție . Sistemele de testare determină nivelurile relative de expresie genică după ce au fost efectuate astfel de modificări .

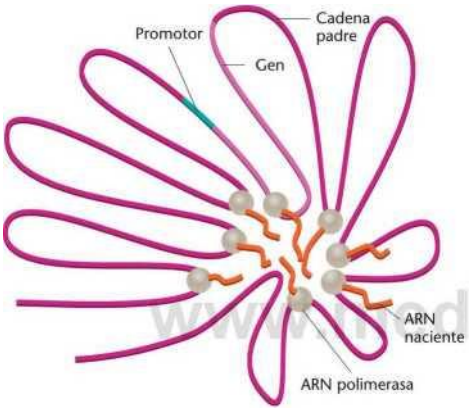
14. Interferența ARN începe cu procesarea unui ARN bicatenar de către o proteină numită Dicer, care , în combinație cu RISC, generează ARN interferent scurt (siARN). Derularea siARN-ului produce o catenă antisens care se combină cu o proteină pentru a tăia secvențe de ARNm complementare . Aceste ARN-uri scurte, numite microARN-uri , se împerechează cu regiunile 3 ' netraduse ale ARNm-urilor și blochează traducerea acestora .

16. Secvențele Inr , BRE, DPE și MTE sunt elemente de ADN bicatenar situate la situsul de inițiere a transcripției (Inr), imediat în amonte sau în aval de cutia TATA (BRE) sau în aval (DPE, MTE) de situsul de transcripție (+18 până la +27 și respectiv +28 până la 4-33).

18. Întrucât metilarea ADN-ului joacă un rol în exprimarea genelor la mamifere , orice modificare a metilării ADN-ului , fie ea pozitivă sau negativă, poate avea un impact negativ asupra dezvoltării puilor . În plus, deoarece m'C → timină, tranzițiile sunt susceptibile de a provoca mutații în regiunile codificatoare ale ADN-ului . Atunci când modelele de metilare se schimbă , apar noi situsuri pentru mutații . Dacă mutațiile apar cu o rată mai mare în situsuri (gene) anterior nemetilate , este probabil ca dezvoltarea embrionară să fie afectată .

20. Întrucât există mai multe căi care duc la cancer, ne-am putea aștepta să fie implicate sisteme de reglare complexe. Mai precis, în timp ce în unele cazuri reglarea negativă a unei gene, cum ar fi o oncogenă, poate fi o terapie rezonabilă împotriva cancerului, reglarea negativă a unei gene supresoare tumorale ar fi nedorită ca terapie.

22. Următoarea diagramă prezintă mai multe molecule de ARN polimerază (cercuri umplute) în ceea ce ar putea fi o fabrică de transcripție. Această diagramă prezintă opt molecule de ARN poi II care se transcriu. Transcrierile care ies din moleculele de ARN poi II sunt prezentate. Pentru simplitate, sunt prezentate doar un promotor și o genă structurală .



24. Deoarece stabilitatea ARNm este direct legată de probabilitatea translației, am putea utiliza structuri diferite, așa cum se arată mai jos , și testa activitatea luciferazei în sistemul descris în problemă.

ARNm cu capac 5′ și coadă 3′ (fără capac sau coadă)

— —+

\+ -+

26. Dacă transportul ARNm are loc prin difuzie, atunci reglarea ar putea fi realizată prin poziționarea diferitelor concentrații de ribozomi. Cu cât un grup de ribozomi este mai aproape de sursa unui anumit ARNm , cu atât este mai mare probabilitatea ca un anumit ARNm să fie tradus. În plus, anumite regiuni din cadrul celulelor pot fi mai puțin ostile ARNm-urilor care călătoresc, favorizând astfel traducerea anumitor ARNm-uri. Dacă regiunile nucleare își eliberează ARNm-urile în locații diferite din jurul nucleului, atunci chiar dacă difuzia este modul de transport al ARNm, diferite domenii celulare ar primi diferite tipuri de ARNm. Dacă astfel de domenii au eficiențe de traducere variabile, atunci s-ar realiza reglarea genetică.

28. Când se pierde specificitatea splicingului , se pot observa diverse clase de ARN modificat : (1) diverse variante nespecifice care produc ansambluri de ARN cu diverse lungimi și combinații de exoni și introni,

(2) splicing incomplet în care intronii și exonii sunt incluși sau excluși în mod eronat în produsul ARNm și

(3) Diverse produse de splicing care nu aparțin ARN-ului rezultă din degradarea prematură a ARN-ului sau din produse proteice trunchiate . În prezent, nu se știe dacă mecanismele de splicing specifice cancerului sunt cauza sau consecința carcinogenezei . Având în vedere complexitatea inducerii cancerului și menținerea stării celulare transformate , produsele genetice care sunt importante în reglarea ciclului celular pot fi cu siguranță influențate de mecanisme alternative de splicing și, prin urmare , pot contribui la apariția cancerului .

30. Cea mai directă modalitate de a determina dacă secvența GRE nou descoperită în β-globina umană este necesară pentru transcripție ar fi pregătirea unui sistem de testare care include secvența GRE și compararea acestuia cu unul căruia îi lipsește această secvență . Deoarece GRE (elementul de răspuns la glucocorticoid) este influențat de o proteină receptor glucocorticoid numai atunci când se leagă de hormonul glucocorticoid, sunt disponibile și alte tehnici experimentale . Simplu spus , răspunde gena β3-globinei umane la acțiunea stimulatoare a hormonului glucocorticoid ? Dacă nu , este puțin probabil să fie necesar pentru exprimarea corectă și precisă a β3-globinei umane. În mediul hMTILA, transcripția genelor este stimulată atunci când receptorul citoplasmatic se leagă de hormon , permițându -i acestuia să intre în nucleu și să se lege de GRE. Adăugarea hormonului glucocorticoid atât la sistemul β3-globinei umane, cât și la cel hMTIIA ar indica , în studii , dacă cele două sisteme răspund similar.

Capitolul 18

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

18.1 Este posibil ca screening-ul nostru să fi fost mai incluziv; adică , să fi identificat modificări mai subtile decât screening -ul efectuat de alții. În plus, screening-ul nostru ar fi putut include unele mutații cu efect zigotic care depindeau de acțiunea genelor cu efect matern . De asemenea , este posibil să fi identificat mai multe mutații diferite (alele multiple) în unele dintre aceleași gene.

18.2 Întrucât în embrionii *ftz/ftz* , Produsul genei *engrailed* este absent, iar în embrionii en/en expresia genei ftz este normală, putem concluziona că produsul genei *ftz* reglează , *direct* sau indirect , en . *Deoarece* gena ftz *este* exprimată *în* mod normal în embrioni en */en,* Produsul genei engrailed nu *reglează expresia* ftz .

18.3 Întrucât interacțiunile semnal-receptor depind de structurile legate de membrană, calea poate funcționa doar cu celulele adiacente. Avantajul unui astfel de sistem este că vor fi influențate doar celulele prezente într - o anumită locație - cele aflate în contact . Un dezavantaj ar apărea dacă ar trebui induse

grupuri mari de celule către o anumită cale de dezvoltare sau dacă ar fi necesar să se inducă celule care nu sunt în contact.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Determinarea se referă la evenimentele timpurii de dezvoltare și reglare care stabilesc modelele finale ale activității genelor. Determinarea nu este rezultatul final al activității reglatoare; mai degrabă, este procesul prin care este fixată soarta dezvoltării unui anumit tip de celulă. Diferențierea, *pe de* altă parte, urmează determinării și este manifestarea, în termeni de modificări genetice, fiziologice și morfologice, a stării determinate.

4. Blastodermul sincițial se formează pe măsură ce nucleii migrează spre cortex, sau marginea externă, a ovulului, unde au loc diviziuni ulterioare. Membranele plasmatice se organizează în jurul fiecărui nucleu din cortex, creând astfel blastodermul celular.

6. (a, b) Genele zigotice sunt activate sau reprimate în funcție de răspunsul lor la produșii genelor efectoare materne. Trei subgrupuri de gene zigotice împart embrionul în segmente. Aceste gene de segmentare sunt în mod normal transcrise în embrionul în curs de dezvoltare, iar mutațiile lor duc la fenotipuri letale embrionare.

   (c) Genotipul matern are gene zigotice și acestea sunt transmise - embrionului, ca orice altă genă.

8. Deoarece citoplasma polară conține informațiile necesare pentru a forma celule germinale, ne-am putea aștepta ca un astfel de transplant să genereze celule germinale în regiunea anterioară. Lucrările efectuate de Illmensee și Mahowald în 1974 au permis verificarea acestei ipoteze.

10. În primul rând, se poate determina dacă nivelurile de ARNhn sunt consistente în diferitele tipuri de celule de interes. Acest lucru se face adesea fie prin izolarea directă a ARN-ului și estimarea folosind *Northern blot* , fie prin hibridizare *in situ* . Dacă setul de ARNhn pentru o anumită genă este consistent în mai multe tipuri de celule, atunci controlul transcripțional poate fi exclus . Sprijinul direct pentru ipoteza controlului translațional poate fi obținut prin determinarea, în diferite tipuri de celule, a prezenței unei serii de ARNm cu secvențe comune. Acest lucru se poate face numai atunci când există suficiente cunoștințe pentru a captura și marca ARNm specifice. Uneori, indicii despre controlul translațional prin splicing alternativ pot fi obținute prin examinarea secvenței de aminoacizi a proteinelor. Asemănările în anumite motive structurale/funcționale pot indica splicing alternativ al ARN-ului.

12. O mutație dominantă de tip „gain-of-function" este una care modifică specificitatea modelului de expresie al unei gene sau al unui produs genetic. Mutația *Antp de tip „gain-of-* function" determină exprimarea genei de tip sălbatic *Antennapedia* în discul ochi-antenă, rezultând muște mutante cu picioare pe cap în loc de antene .

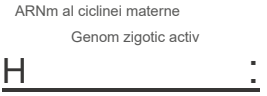
14. Datorită naturii reglatoare a genelor *homeotice* în activitățile celulare fundamentale pentru determinarea și diferențierea celulelor , ar fi dificil să se ignore impactul lor potențial asupra oncogenezei . Genele homeotice codifică domenii de legare a ADN-ului, care influențează expresia genelor , iar orice factor care influențează expresia genelor poate, în anumite circumstanțe, influența controlul ciclului celular .

Totuși , în ciuda atractivității acestui model, transformările homeotice nu au fost observate în glandele mamare și, prin urmare, expresia tipică a genelor homeotice mutante la insecte nu se manifestă în țesuturile mamare, conform lui Lewis (2000). Un număr considerabil de experimente vor fi necesare pentru a stabili o legătură funcțională între mutația genelor homeotice și inducerea cancerului. Experimentele de mutageneză și transgeneză sunt probabil cele mai productive în stabilirea unei relații cauză - efect .

16. În flori sunt cunoscute trei clase de gene *homeotice* , care sunt activate conform unui model suprapus pentru a specifica diverse organe florale. Genele clasei *A* Acestea dau naștere sepalelor. Expresia genelor din clasele *A și B* specifică petalele , genele B *și C* controlează formarea staminelor , iar exprimarea genelor C dă naștere carpelelor.

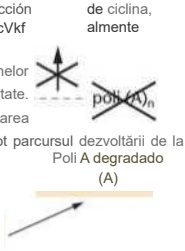
18. Remodelare anterioară Producție rapidă de ciclină, în ciclul celular : dirijată matern

Remodelare după ciclul celular:



20. (a) Termenul *„salvat"* este adesea folosit atunci când introducerea de gene dintr -o sursă externă (în cadrul aceleiași specii sau dintr-o specie diferită) restabilește fenotipul de tip sălbatic într-un organism mutant.

(b) Rezultate de acest tip (și există multe de acest tip) indică gradul ridicat de conservare a funcției și structurii proteinelor printre organismele filogenetic îndepărtate. Astfel de rezultate atestă conservarea tipurilor moleculare fundamentale pe tot parcursul dezvoltării de la un strămoș comun îndepărtat. Eșecul de a respecta un model comun de dezvoltare este recompensat cu moartea.



22. De *când* mutațiile ei Întrucât gena her-1 determină dezvoltarea masculilor ca hermafroditi, iar mutațiile *tra-T* determină dezvoltarea hermafroditilor ca masculi, am putea avansa ipoteza că gena *her-1* generează un produs care suprimă dezvoltarea hermafrodită, în timp ce

produsul genei *tra-T* este necesar pentru dezvoltarea unui hermafrodit.

24. (a) Modelele corespund într-o oarecare măsură așteptărilor, în sensul că genele implicate în fotosinteză par a fi mai active în frunză și floare. În plus, nivelurile ridicate de sinteză proteică în rădăcină sunt perfect rezonabile. Întrucât polenul și semințele vor fi necesare într-un stadiu incipient de dezvoltare, pare rezonabil ca aceste țesuturi să prezinte o expresie ridicată a regulatorilor transcripționali.
    (b) Doi factori pot influența exprimarea genelor fotosintetice în flori și semințe. În primul rând, deoarece dezvoltarea la plante este mai continuă sau secvențială, genele nu vor fi neapărat dezactivate atunci când produsele lor nu sunt necesare. În al doilea rând, mai multe modificări post-transcripționale pot redirecționa funcția produselor genetice fotosintetice. Cu alte cuvinte, este posibil să fi evoluat utilizări alternative pentru aceste produse genetice la plante, similar cu ceea ce se observă în unele țesuturi animale.
    (c) O imagine cuprinzătoare a expresiei genelor într-un organism și în diversele sale țesuturi și organe ne permite să estimăm contribuția relativă pe care o anumită genă o poate aduce dezvoltării . Întrucât rețelele de dezvoltare și transcripționale sunt comune pe tot parcursul dezvoltării, este util să înțelegem contextul în care o anumită genă poate funcționa. În cele din urmă, singura modalitate prin care putem înțelege dezvoltarea la nivel molecular este să avem o perspectivă largă asupra claselor și grupurilor de activitate genică.

Capitolul 19

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

19.1 Diverse tehnici sunt utilizate pentru combaterea LMC. Una dintre acestea implică utilizarea unui inhibitor de tirozin kinază care se leagă competitiv de situsul de legare a ATP al kinazei ABL, inhibând astfel fosforilarea BCR-ABL și prevenind activarea unor căi de semnalizare suplimentare. În plus, RT-PCR (reacția în lanț a polimerazei cu transcripție inversă) cantitativă în timp real permite monitorizarea răspunsurilor la medicamente ale populațiilor celulare la pacienți, cu scopul de a dezvolta tratamente mai puțin toxice și mai eficiente. Capacitatea de a distinge celulele leucemice de celulele sănătoase permite nu numai o terapie țintită către anumite populații celulare, ci și cuantificarea răspunsurilor la terapia respectivă. Deoarece astfel de celule produc o proteină hibridă , ar putea fi posibilă dezvoltarea unei terapii, eventual o imunoterapie, bazată pe caracteristicile specifice ale proteinei BCR/ABL.

19.2 *p53* este o genă supresoare tumorală care protejează celulele de multiplicarea cu ADN deteriorat . Este prezentă în stare mutantă în peste 50% din toate tumorile. Deoarece *p53* mediază controlul imediat al unui punct de control critic și universal al ciclului celular , mutația va afecta o gamă largă de tipuri de celule. Acțiunea *p53* nu se limitează la anumite tipuri de celule .

19.3 Cancerul este o perturbare complexă a controalelor normale ale ciclului celular . Chiar dacă se transmite o genă primară „cauză cancer” , alte gene și adesea mutații noi sunt de obicei necesare pentru a direcționa o celulă spre formarea unei tumori. Expresia completă a fenotipului canceros este probabil rezultatul interacțiunilor dintre diverse gene și, prin urmare, prezintă o penetranță și o expresivitate variabile .

19.4 Din păcate, este ceva obișnuit să se investească sume enorme de bani în tratarea bolilor după ce apar, în loc să se concentreze pe prevenirea lor . Prea des, presiunea din partea anumitor grupuri de interese sau lipsa de voință politică încetinește progresul în educație și prevenție. Evident, este mai puțin costisitor, atât din punct de vedere al suferinței personale , cât și al banilor , să se ia măsuri preventive pentru cât mai multe boli posibil. Cu toate acestea, după ce am dobândit o oarecare înțelegere a mecanismelor unei boli, în acest caz cancerul, trebuie afirmat și că , indiferent de măsurile preventive luate, va fi imposibil să eliminăm complet boala din populația umană. Este extrem de important, însă, să depunem toate eforturile pentru a educa și proteja populația umană de cât mai mulți agenți de mediu periculoși . Prin urmare, pare oportun să se utilizeze o abordare echilibrată , cu multiple linii de acțiune.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

4. Kinazele reglează alte proteine prin adăugarea de fosfați la grupări . Ciclinele se leagă de kinaze , activându-le sau dezactivându- le. CDK4 se leagă de ciclina D, mutând celulele din faza Gl în faza S. La limita G2/mitoză, CDK1 (o kinază dependentă de ciclină) se combină cu o altă ciclină (ciclina B). Are loc fosforilarea , provocând o serie de modificări la nivelul membranei nucleare prin intermediul caldesmonei, citoscheletului și histonei H.

6. A spune că o anumită trăsătură este moștenită implică faptul că fenotipul său va fi revelat în anumite circumstanțe genetice . Atunci când se discută despre predispozițiile ereditare , se face referire, în general, la situații în care un anumit fenotip este exprimat în familii urmând un model consecvent. Cu toate acestea , fenotipul poate să nu fie întotdeauna exprimat sau se poate manifesta în diverse moduri . În retinoblastom , gena este moștenită într-o manieră autosomal dominantă , iar indivizii care moștenesc alela RB mutantă sunt predispuși la dezvoltarea unei tumori oculare . Cu toate acestea, aproximativ 10 % dintre indivizii despre care se știe că au moștenit gena nu o exprimă de fapt , iar în unele cazuri , exprimarea acesteia implică doar un ochi în loc de ambele.

8. Apoptoza sau moartea celulară programată este un proces controlat genetic care duce la moartea

celulară .

Este un proces natural implicat în morfogeneză și este, de asemenea, un mecanism de protecție împotriva formării cancerului. În timpul apoptozei, fragmentele de ADN nuclear, structurile celulare se descompun, iar celulele se dizolvă . Caspazele sunt implicate în inițierea și progresia apoptozei.

10. Forma nefosforilată a pRB se leagă de factori de transcripție precum E2F, provocând inactivarea și supresia ciclului celular. Fosforilarea pRB activează ciclul celular prin eliberarea factorilor de transcripție (E2F) pentru avansarea ciclului. Cu situsul de fosforilare inactivat în forma PSM-RB, fosforilarea nu poate avea loc, lăsând astfel ciclul celular într-o stare suprimată.
12. Mai multe kinaze pot fi activate prin rupturi ale ADN-ului. O kinază numită ATM și/sau o kinază numită Chk2 fosforilează BRCA1 și p53. P53 activat oprește replicarea în timpul fazei S pentru a facilita repararea ADN-ului. BRCA1 activat, împreună cu BRCA2, mRAD51 și alte proteine nucleare, este implicat în repararea ADN-ului.
14. Mutațiile care produc oncogene modifică expresia genelor direct sau indirect și acționează într-o manieră dominantă . Proto-oncogenele sunt gene care în mod normal funcționează pentru a promova sau menține diviziunea celulară. În starea lor mutantă (oncogene), acestea induc sau mențin diviziunea celulară necontrolată; adică, are loc un câștig de funcție. În general, acest câștig de funcție ia forma unei producții de gene crescute sau anormal de continue. Pe de altă parte, pierderea funcției este în general atribuită mutațiilor genelor supresoare tumorale, care funcționează pentru a opri progresia prin ciclul celular. Când aceste gene sunt mutante, ele și-au pierdut capacitatea de a opri ciclul celular. Astfel de mutații sunt în general recesive.
16. Pentru a încuraja creșterea și diviziunea celulelor infectate , virusurile codifică adesea gene care stimulează creșterea și diviziunea. Multe virusuri fie inactivează genele supresoare tumorale ale gazdei, fie contribuie cu gene care stimulează creșterea și diviziunea celulară. Prin inactivarea genelor supresoare tumorale, mecanismul normal de oprire a ciclului celular este perturbat.
18. Celulele normale sunt adesea capabile să reziste atacurilor mutaționale deoarece punctele lor de control ale ADN-ului și mecanismele de reparare funcționează corect. Atunci când aceste mecanisme eșuează, se poate dezvolta cancer. Prin mutație, aceste mecanisme de protecție sunt compromise în celulele canceroase, rezultând rate de mutație mai mari decât în mod normal, rate de anomalii cromozomiale și instabilitate genomică.
20. Efectele epigenetice pot fi cauzate de metilarea ADN-ului și/sau modificări ale histonei, inclusiv acetilarea și/sau fosforilarea. Prin urmare, acestea pot reduce la tăcere sau activa cromozomi (de exemplu, cromozomul X) sau anumite regiuni cromozomiale și pot fi responsabile de imprimarea maternă sau pot influența activitatea genelor în heterocromatină. Modelele de demetilare și hipermetilare a nucleotidelor diferă adesea între celulele canceroase și celulele normale .
22. Nu, veți avea în continuare riscul populației generale, care este de aproximativ 10 %. În plus, testele genetice pot să nu detecteze toate mutațiile cancerului de sân .
24. Proteazele în general, și proteazele serice în special, sunt considerate agenți promotori de tumori, deoarece degradează proteinele, în special pe cele găsite în matricea extracelulară. Atunci când are loc această proteoliză , sunt încurajate invazia celulară și metastazele . În concordanță cu această observație, există dovezi ample că celulele tumorale metastatice sunt asociate cu niveluri de expresie a proteazei mai mari decât în mod normal. Inhibitorii serinei proteazei sunt adesea testați pentru eficacitatea lor împotriva cancerului .
26. (a) Deoarece lucrăm cu celule somatice , testele de compatibilitate încrucișată pentru heterozigoție nu sunt disponibile . Prin urmare , trebuie să folosim tehnici chimice/fizice pentru a răspunde la întrebare. O bibliotecă genomică ar putea fi construită din ADN-ul celulelor de osteosarcom și al *celulelor* necanceroase din același organism. Această bibliotecă ar putea fi apoi analizată folosind sonde marcate din clonele disponibile care poartă gena RBI . așa cum este indicat în problemă. În acest moment, am putea obține câteva indicii, deoarece, dacă există o modificare semnificativă a genelor RBI *mutante* , sondele s-ar putea să nu hibridizeze în mod adecvat cu nicio clonă din biblioteca de ADN a celulelor canceroase . Presupunând că hibridizarea de control are loc în celulele non - canceroase, lipsa hibridizării în biblioteca derivată din linia celulară de osteosarcom ar putea indica deleții . *Cu* toate acestea , presupunând că hibridizarea ne permite să identificăm clone care conțin presupuse alele *RBI* , efectuarea subclonării cu vectori adecvați ar putea permite secvențierii să dezvăluie modificări de secvență în alelele RBI , în comparație cu genele non - mutante. O a doua tehnică combină un imunotest descris în partea (b) a acestei probleme. Presupunând că putem produce în mod adecvat anticorpi pentru produsul genei *RBI* normal (pRB), lipsa reactivității încrucișate a anticorpilor pRB cu proteinele din linia celulară canceroasă ar indica faptul că ambele alele *RBI* Ei sunt mutanți.

(b) Așa cum s-a indicat în ultima parte a secțiunii (a) de mai sus , putem produce anticorpi pRB din celule necanceroase și testa acești anticorpi pentru a le vedea reactivitatea împotriva proteinelor din liniile celulare canceroase . O reacție pRB -anticorp ar indica faptul că proteina pRB este produsă.

(c) Pentru a determina dacă adăugarea unei gene *RBI* normale ar modifica potențialul de provocare a cancerului al celulelor de osteosarcom, am transfera gena *RBI* . Celulele normale sunt clonate prin transformare sau transfecție (adesea folosind electroporație sau ultrasunete). Celulele transformate sunt apoi introduse în șoareci predispuși la cancer pentru a determina dacă potențialul lor cancerigen

a fost modificat .

28. (a, b) Chiar dacă există modificări ale *genei BRCA1,* acestea nu au întotdeauna consecințe fiziologice. Astfel de polimorfisme neutre îngreunează screening-ul, deoarece nu putem fi niciodată siguri că o mutație va cauza probleme pacientului.

(c) Polimorfismul din *PM2* este posibil o mutație silențioasă, deoarece implică a treia bază a codonului.

(d) Polimorfismul din *PM3* este posibil o mutație neutră de tip missense, deoarece implică prima bază. Cu toate acestea, deoarece există o oarecare degenerare la prima poziție a codonului, mutația poate fi silențioasă.

Capitolul 20

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

20.1 (a) Bacterii care au fost transformate cu plasmida

Celulele recombinante vor fi rezistente la tetraciclină, așa că tetraciclina trebuie adăugată în mediu.

(b) Coloniile care cresc pe mediu care conține tetraciclină ar trebui să conțină doar insertul. Bacteriile care nu cresc pe mediu care conține ampicilină conțin probabil insertul de ADN de Drosophila .

(c) Rezistența la ambele antibiotice la o bacterie transformată ar putea fi explicată în mai multe moduri. În primul rând, dacă scindarea cu *PstI* ar fi incompletă, atunci nu ar fi de așteptat nicio modificare a proprietăților biologice ale plasmidelor nescindate. Alternativ, este posibil ca capetele scindate ale plasmidei să fi fost ligate împreună în forma lor originală fără nicio inserție .

20.2 Un filtru este utilizat pentru a se lega de ADN-ul coloniilor care conțin plasmide recombinante. O sondă marcată este construită pentru secvența proteinei EF-la. Deoarece este foarte conservată, ar trebui să prezinte o complementaritate considerabilă cu ADNc-ul EF-la uman. Este utilizată pentru a detecta ADN-ul de interes prin hibridizare. Celulele cu clona dorită sunt apoi îndepărtate de pe placa originală, iar plasmida este izolată din celule.

20.3 Deoarece perechile de baze GC conțin trei legături de hidrogen, este necesară mai multă energie pentru a separa ADN -ul bogat în GC decât ADN-ul bogat în AT. La hibridizarea unui primer la șablon, se selectează de obicei cea mai ridicată temperatură de hibridizare, dar totuși stabilă . Această practică minimizează probabilitatea unei hibridizări imperfecte . Cunoașterea procentului de perechi de baze GC ne permite să maximizăm acuratețea hibridizării.

20.4 Adesea, vectorul de clonare în sine conține secvențe cunoscute care flanchează ADN-ul inserat. În astfel de cazuri, este ușor să se utilizeze primeri standard pentru situsul vector specific . Deoarece avem o multitudine de date despre genele mamiferelor în general, genele de interes au fost probabil deja studiate în detaliu la o specie înrudită. În acest caz, se pot selecta secvențe care flanchează sau includ ADN-ul de interes, iar clonarea cu succes poate fi realizată prin PCR. În unele cazuri în care există incertitudine privind secvența , se poate utiliza un set de primeri degenerați . Deoarece primerii conțin un set de secvențe similare , unii membri ai setului ar putea prezenta eficiența necesară pentru amorsarea unei reacții PCR .

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Enzime specifice, numite *endonucleaze de restricție* , taie ADN-ul în locuri specifice și uneori furnizează capete „lipicioase”, astfel încât pot apărea interacțiuni ulterioare cu moleculele de ADN tăiate de aceeași clasă de enzime. Izolate din bacterii, enzimele de restricție pot fi clasificate în mai multe tipuri distincte , fiecare cu propriile particularități în ceea ce privește structura și interacțiunea cu ADN-ul . Un vector poate fi o plasmidă, un bacteriofag sau o cosmidă care primește, prin ligare, unul sau mai multe fragmente de ADN străin . Vectorul recombinant poate transforma (sau transfecta) o celulă gazdă (bacterii, celule de drojdie etc.) și poate fi amplificat în funcție de numărul de copii .

4. Într -un experiment de clonare a ADN-ului , ADN ligaza este utilizată pentru a genera legăturile covalente ale scheletului fosfodiesteric, pentru a obține o moleculă de ADN bicatenar intactă . Enzimele de restricție, la rândul lor, rup aceste legături.

6. Acest segment conține secvența palindromă GGATCC, care este recunoscută de enzima de restricție BamHI. Secvența dublu catenară este următoarea:

CCTAGG
GGATCC

8. Plasmidele au fost primii vectori utilizați în clonare și sunt încă utilizate în mod curent pentru a clona fragmente relativ mici de ADN. Datorită dimensiunilor lor reduse, acestea sunt ușor de separat de cromozomul bacterian gazdă și au relativ puține situsuri de restricție . Pot fi modificate relativ ușor (de exemplu, prin adăugarea mai multor situsuri de clonare și gene reporter). Pentru a clona fragmente de ADN mai lungi, cum ar fi gene eucariote întregi, se utilizează adesea așa-numitele cosmide . De exemplu, atunci când se fac modificări la virusul bacterian (X), se pot clona inserții relativ mari, de aproximativ 20 kb. Acesta este un avantaj important atunci când este necesar să se cloneze o genă mare sau să se genereze o bibliotecă de genomi dintr-un eucariot . În plus , unele cosmide acceptă doar inserții de dimensiuni limitate, ceea ce înseamnă că fragmente mici și poate mai puțin semnificative nu vor fi clonate inutil. Atât plasmidele , cât și cosmidele sunt limitate prin faptul că pot utiliza doar bacterii ca gazde. Cromozomii bacterieni (BAC) sunt cromozomi bacterieni artificiali care pot fi modificați pentru a poseda anumite calități.

Cromozomii artificiali de drojdie (YAC) conțin telomeri, o origine de replicări și un centromer și sunt utilizați pe scară largă pentru clonarea ADN-ului la drojdie. Cu markeri selectabili (TRP1 și URA3) și un set de situsuri de restricție , inserturile de ADN cu dimensiuni cuprinse între 100 kb și 1000 kb pot fi donate în drojdie

. Deoarece drojdia, un organism eucariot, efectuează multe dintre etapele de procesare a ARN-ului și proteinelor tipice altor eucariote mai complexe, aceasta oferă numeroase avantaje atunci când se lucrează cu gene eucariote.

10. Nu. Plasmida inductoare de tumori (Ti) utilizată pentru a produce plante modificate genetic este specifică bacteriei *Agrobacterium tunufaeens,* care provoacă tumori la multe specii de plante. Nu există niciun pericol ca această plasmidă inductoare de tumori să provoace tumori la oameni.

12. Numărul total de molecule după 15 cicluri ar fi de 16,384 O(2) ᴴ .

14. Folosind secvența de nucleotide umane, putem genera o sondă pentru a scana biblioteca genetică de okapi african. În al doilea rând, putem utiliza secvența de aminoacizi și codul genetic pentru a genera o sondă ADN complementară pentru scanarea bibliotecii genetice. Sonda este apoi utilizată, prin hibridizare, pentru a identifica ADN-ul complementar, permițându-ne să localizăm clona bibliotecii genetice care conține ADN-ul de interes. Celulele care conțin clona dorită sunt apoi extrase de pe placa originală, iar plasmida este izolată din celule.

16. Clona genomică conținea probabil un număr de introni care au fost eliminați din ARNm în timpul procesării. ADNc-ul a fost preparat din ARNm.

18. Mai mulți factori pot contribui la subreprezentarea capătului 5' al ARNm. Unul este posibilitatea ca transcriptaza inversă să nu sintetizeze complet ADN-ul din matrița ARN. Un alt motiv poate fi faptul că capătul 3' al ADN-ului copiat tinde să se plieze înapoi pe sine, oferind astfel un primer pentru ADN polimerază. Prepararea ulterioară a ADNc necesită o anumită digestie a acestei regiuni pliate. Deoarece această regiune pliată corespunde capătului 5' al ARNm, o parte a mesajului se pierde adesea.

20. Presupunând că cunoaștem secvența de aminoacizi a produsului proteic sau secvența de nucleotide a acidului nucleic țintă, putem genera un set degenerat de catene de ADN care pot fi preparate pentru clonare într-un vector adecvat sau amplificate prin PCR. Diverse tehnici de marcare, utilizând hibridizarea, pot fi apoi utilizate pentru a identifica secvențele de baze complementare conținute în biblioteca genomică. Trebuie să cunoaștem cel puțin o parte din secvența de aminoacizi a produsului proteic sau secvența sa de acid nucleic pentru a aplica această procedură. Pot apărea unele probleme din cauza degenerării codului genetic (care ar împiedica construirea unei sonde adecvate), a posibilei existențe a pseudogenelor în bibliotecă (hibridizări cu fragmente înrudite necorespunzător ale bibliotecii) și a variabilității secvențelor de ADN din bibliotecă din cauza intronilor (ceea ce ar duce la o hibridizare inadecvată). Pentru a aborda unele dintre aceste probleme, se pot construi mai multe sonde relativ mici de diferite tipuri care iau în considerare degenerarea codului. Prin variația condițiilor de hibridizare (sare și temperatură), se poate reduce numărul de hibridizări nedorite .

22. (a) Încălzirea la 90-95°C denaturează ADN-ul bicatenar , astfel încât acesta se disociază în catene simple. Aceasta durează de obicei aproximativ cinci minute, în funcție de lungimea și conținutul GC al ADN-ului.
    (b) Reducerea temperaturii la 50-70°C permite primerilor să se lege de ADN -ul denaturat .
    (c) Creșterea temperaturii la 70-75°C permite ADN polimerazei termostabile să extindă primerii prin adăugarea de nucleotide la capătul 3' al fiecărei catene în creștere. Fiecare PCR este conceput cu temperaturi specifice (nu intervale) bazate pe caracteristicile ADN -ului utilizat (șablon și primeri).

24. ddNTP-urile sunt analogi ai dezoxiribonucleotidelor trifosfați (dNTP) „normali”, dar le lipsește o grupare hidroxil 3 ' . Pe măsură ce are loc sinteza ADN-ului , ADN polimeraza introduce ocazional un ddNTP într-o catenă de ADN în creștere . Din cauza grupării hidroxil 3', alungirea lanțului nu poate avea loc și se formează o serie de fragmente , care pot fi separate prin electroforeză. Datorită încorporării ddNTP- ului , putem determina lungimea fiecărei catene și, prin urmare, poziția acelui ddNTP specific, folosind aceste date pentru a obține secvența de baze care alcătuiește ADN-ul.

26. FISH implică hibridizarea unei sonde marcate la o catenă de ADN complementară de pe un cromozom. Prin urmare , poate fi utilizată pentru a localiza o secvență specifică de ADN (adesea o genă sau un fragment de genă) în cadrul unui cromozom. Cariotiparea spectrală utilizează FISH pentru a detecta cromozomi individuali , oferind un avantaj distinct în identificarea anomaliilor cromozomiale.

28. T _m (°C) = 81,5 - 0,41(%GC) - (675/N) = 81,5 + 0,41(33,3) - (675/21) = aproximativ 63 °C. Scăzând 5 °C, obținem un punct de plecare bun de aproximativ 58 °C pentru PCR cu acest primer. Rețineți că pe măsură ce procentul de GC și lungimea cresc, crește și T _a (°C). Perechile GC conțin trei legături de hidrogen , în loc de cele două care există între perechile AT .

30. (a) Repetițiile scurte în tandem ale cromozomului Y (Y-STR) variază considerabil între indivizi și populații . Prin amplificarea Y-STR folosind PCR și separarea produselor amplificate prin electroforeză, putem caracteriza genotipic un individ, la fel cum procedăm și cu amprentele digitale. Deoarece probele de țesut sunt adesea lăsate la locul unei infracțiuni violente, amprentele genetice sunt mai probabil disponibile decât amprentele digitale normale . Stabilirea legăturii dintre o persoană și momentul și locul în care a avut loc un eveniment semnificativ are multiple aplicații criminalistice . Eliminarea unui individ ca suspect are, de asemenea, aplicații criminalistice .
    (b) Regiunea nerecombinanta a cromozomului Y este strict menținută în populația masculină

.

De o relevanță deosebită pentru aplicațiile criminalistice ar fi eliminarea a jumătate din populație (femei) dintr-un grup de suspecți.

(c) Întrucât diferite grupuri etnice prezintă niveluri variabile de polimorfism Y-STR, vom obține probabilități finale diferite ca produs al probabilităților individuale. Deoarece aceste probabilități sunt utilizate pentru a identifica anumite persoane în aplicațiile criminalistice, este necesar să se țină cont de variațiile etnice.

(d) Deși probele de ADN au multe utilizări potențiale , compatibilitățile sunt în general determinate prin înmulțirea probabilităților fiecărui haplotip pentru a obține probabilitatea generală (produsul) ca un anumit genotip să apară într-o populație specifică. Dacă genotipul unei persoane se potrivește cu ADN-ul găsit la locul crimei , atunci putem spune că persoana respectivă a fost la locul crimei, în funcție de frecvențele haplotipurilor. Cu toate acestea, contaminarea , genotiparea necorespunzătoare și propria experiență a laboratorului pot produce atât rezultate fals pozitive, cât și fals negative. Gemenii identici au amprente genetice identice și pot complica aplicațiile criminalistice.

Capitolul 21

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

21.1. Programele software identifică cadrele de citire deschise (ORF-uri) pe baza identificării codonilor de început (ATG) și de sfârșit (TAA, TGA, TAG). Rețineți că procentul de perechi GC comparativ cu perechile AT este foarte scăzut în acești codoni. Prin urmare, atunci când se analizează secvențe de ADN pentru ORF-uri bogate în AT, se obțin multe secvențe scurte care, evident, este puțin probabil să fie implicate în producerea de proteine. Cu toate acestea, atunci când ADN-ul este bogat în GC, probabilitatea obținerii de ORF-uri cu o dimensiune similară cu cea necesară pentru codificarea proteinelor crește. Prin urmare, probabilitatea identificării false a unei secvențe ca fiind „codificatoare de proteine” crește odată cu creșterea conținutului de GC, așa cum se arată în figură.

21.2 (a) Presupunând o dimensiune medie a genei de 5.000 de perechi În ceea ce privește bazele, ar exista aproximativ $6,7 \times 10^{-11}$ perechi de baze care formează gene. Scăzând această valoare din cei 116,8 Mb, obținem 49,8 Mb între gene. Împărțind 49,8 Mb la 13.379 de gene, obținem aproximativ 3.700 de baze între gene.

(b) 54.934/13.379 = 4,11 exoni

(c) 48.257/13.379 = 3.61 introni

(d) Există o creștere semnificativă a numărului de gene implicate în transcrierile alternative .

21.3 Întrucât factorii structurali și chimici determină funcția unei proteine , este foarte probabil ca mai multe proteine să aibă o identitate considerabilă în secvențele lor de aminoacizi, dar fără a fi identice din punct de vedere funcțional . Întrucât funcția *in vivo* Funcția acestor proteine este determinată de structurile lor secundare și terțiare , precum și de chimia de suprafață locală la situsurile active sau funcționale. Aceste secvențe neidentice pot avea o influență considerabilă asupra funcției proteinelor . Rețineți că interogarea găsește corespondențe cu diferite poziții ale situsurilor în cadrul proteinelor țintă . Alți factori care sugerează existența unor funcții diferite sunt: asocierile cu alte molecule (citoplasmatice, membranare sau extracelulare), poziția și natura chimică a situsurilor de legare, modificările post - translaționale , secvențele de semnalizare etc.

21.4 Întrucât sângele este relativ ușor de obținut în stare pură , componentele sale pot fi analizate fără teama contaminării țesuturilor . În al doilea rând, sângele este în contact strâns cu practic toate celulele din organism și, prin urmare, poate transporta markeri chimici către anumite celule anormale. Teoretic, este o sondă ideală pentru înțelegerea corpului uman. Cu toate acestea, atunci când se prelevează sânge din organism, proteomul său se modifică, iar aceste modificări depind de o serie de factori de mediu . Prin urmare, ceea ce ar putea fi diagnostic pentru o boală poate să nu fie pentru altele. În plus, proteomul seric este supus modificărilor în funcție de starea genetică, fiziologică și de mediu a pacientului . Alte variabile de luat în considerare includ vârsta și sexul . Validarea unui proteom plasmatic pentru un anumit cancer ar fi consolidată prin demonstrarea faptului că stadiul de dezvoltare a cancerului este corelat cu o modificare măsurabilă a proteomului, utilizând o populație de pacienți suficient de mare și semnificativă statistic . În al doilea rând , tipurile de modificări ale proteomului ar trebui să fie reproductibile și, cel puțin până când aspectele mai complexe sunt clarificate, să implice proteine tumorigene . Ar fi util să se facă comparații cu probe arhivate de la fiecare individ, corespunzătoare unei perioade în care acesta nu suferea de boală.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Genomica funcțională urmărește să înțeleagă componentele funcționale ale genomului și asemănările dintre genomuri pe distanțe filogenetice și evolutive . Genomica comparativă analizează aranjamentul și organizarea familiilor de gene în cadrul genomurilor și între diferite genomuri .

4. Genomurile ambelor tipuri de organisme sunt compuse din ADN bicatenar (mai mare la eucariote) asociat cu proteine (mai tranzitoriu la procariote) . Ambele conțin cadre de citire deschise , dar cele ale procariotelor sunt mai dens împachetate . Ambele au unele gene care formează clustere, dar aceste clustere sunt mult mai pronunțate la procariote (operoni). Există câteva secvențe repetitive la procariote, dar această tendință este mult mai frecventă la eucariote . Ambele conțin secvențe de informație, dar cele ale eucariotelor sunt adesea întrerupte

(introni). Aproape toate genomurile conțin elemente transpozabile.

6. Principalele obiective ale Proiectului Genomului Uman sunt de a stabili, clasifica și analiza funcțiile genelor umane . După cum se menționează în text:

> Analizați variațiile genetice la oameni, inclusiv identificarea polimorfismelor cu un singur nucleotid (SNP).
>
> Pentru a cartografia și secvența genomurilor mai multor organisme model utilizate în genetica experimentală, inclusiv *E. coli,* S. *cerevisiae, C. elegans, D. melanogaster* și M. *musculus* (șoarece).
>
> Dezvoltarea de noi tehnologii de secvențiere, cum ar fi secvențiatoarele de mare randament automatizate de computer, pentru a facilita analiza genomică .
>
> Diseminarea informațiilor genomice atât în rândul oamenilor de știință , cât și al publicului larg.

8. O tehnică inițială pentru adnotarea unei secvențe implică compararea ADN-ului genomic nou secvențiat cu secvențe cunoscute deja stocate în diverse baze de date. *Centrul Național pentru Informații Biotehnologice* (NCBI) oferă acces la software-ul BLAST *(Basic Local Alignment Search Tool),* care ghidează o serie de căutări prin bazele de date de secvențe de ADN și proteine. Un segment de ADN poate fi comparat cu secvențele conținute în unele dintre principalele baze de date , cum ar fi GenBank, pentru a identifica potriviri care se aliniază complet sau parțial. Se pot căuta asemănări pentru o secvență de pe cromozomul 11 al șoarecelui, iar acea secvență sau unele similare pot fi găsite într-o gamă de taxoni. BLAST calculează un scor de similaritate sau o valoare de identitate pentru a indica gradul de similaritate dintre două secvențe. BLAST este unul dintre numeroșii algoritmi de aliniere a secvențelor (ARN-ARN, proteină-proteină etc.) care pot sacrifica precizia în favoarea vitezei.

10. Genomul uman este alcătuit din peste 3 miliarde de nucleotide, dintre care aproximativ două procente codifică gene. Genele sunt distribuite inegal pe cromozomi, cu grupuri bogate în gene separate de regiuni sărace în gene (deșerturi). Genele umane tind să fie mai lungi și să conțină mai mulți introni (care sunt și mai mari) decât cele ale nevertebratelor, cum ar fi *Drosophila.* Se estimează că cel puțin jumătate dintre gene generează produse prin splicing alternativ . Sute de gene au fost transferate de la bacterii la vertebrate. Regiunile duplicate sunt frecvente, ceea ce poate facilita rearanjarea cromozomială. Genomul uman pare să conțină aproximativ 20.000 de gene care codifică proteine. Cu toate acestea, - există incertitudine cu privire la numărul total real.

12. Întrucât multe regiuni repetitive ale genomului nu sunt implicate direct în producerea unui fenotip, acestea tind să fie izolate de mecanismele de selecție și prezintă variații considerabile în ceea ce privește redundanța . Variația lungimii acestor repetiții este caracteristică fiecărui individ (cu excepția gemenilor identici) și, cu diverse metode de detectare , oferă baza amprentei genetice . Polimorfismele cu un singur nucleotid apar, de asemenea , frecvent în genom și pot fi utilizate pentru a distinge un individ de altul.

14. Proiectul Genomului Personal (PGP) oferă secvențe individuale de genomuri diploide , iar rezultatele unor astfel de proiecte indică faptul că proiectul HGP ar fi putut subestima variația genomică cu un factor de cinci . Variația genomică între indivizi ar putea fi de 0,5 % , față de 0,1% estimat în cadrul proiectului HGP. Deoarece PGP oferă informații despre secvențe despre indivizi, este posibil să putem răspunde mai bine la o serie de întrebări fundamentale despre diversitatea și evoluția umană .

16. O serie de noi subdiscipline ale biologiei moleculare vor oferi infrastructura pentru progrese majore în sarcina noastră de a înțelege sistemele biologice . Următorii termeni identifică câteva domenii specifice din cadrul acestei infrastructuri:

> Proteomică - proteine dintr-o celulă sau țesut ; Metabolomică - căi enzimatice; Glicomică - carbohidrați dintr-o celulă sau țesut ; Toxicogenomică - substanțe chimice toxice ; Metagenomică - probleme de mediu; Farmacogenomică - medicină personalizată ; Transcriptomică - gene exprimate.
>
> Se așteaptă ca multe alte discipline „omice" să apară în viitor .

18. Majoritatea cipurilor ADN , cunoscute și sub denumirea de cipuri genetice, constau dintr-o lamă de sticlă, care este acoperită robotic cu molecule de ADN monocatenar . Unele cipuri ADN sunt acoperite cu secvențe monocatenare de markeri de secvență exprimați sau secvențe de ADN care sunt complementare transcrierilor genetice. Un singur cip ADN poate avea până la 20.000 de situsuri ADN distincte, fiecare cu o secvență diferită . Cercetătorii folosesc cipuri ADN pentru a compara modelele de expresie genică în țesuturi în condiții diferite sau pentru a compara modelele de expresie genică în țesuturile normale cu cele afectate de o boală . În plus, cipurile ADN pot fi utilizate pentru a identifica agenți patogeni . Bazele de date cu rezultatele analizei cipurilor ADN permit cercetătorilor să compare orice model dat cu altele deja stocate în bazele de date .

20. Creșterea numărului de proteine produse începând de la aproximativ 20.000 de gene este probabil legată de mecanisme alternative de splicing și de diverse scheme de procesare post-translațională. În plus, fiecare segment specific de ADN poate fi citit în mai multe moduri și în două direcții diferite .

22. Deși familia de gene γ-globinei are o secvență relativ mare (60 kb) și analizele de restricție arată că este compusă din șase gene, una este o pseudogenă

și, prin urmare, nu produce niciun produs. Fiecare dintre cele cinci gene funcționale conține doi introni de dimensiuni similare care, atunci când sunt adăugați la regiunile necodificatoare flancante (5' și 3') și la ADN-ul spacer dintre gene, reprezintă cele 95% menționate în întrebare.

24. Ori de câte ori o secvență de ADN este conservată la alte specii, este probabil ca secvența să influențeze fenotipuri similare. Cu cât este mai mare numărul de specii care conservă secvența, cu atât este mai mare probabilitatea de a-i determina funcția. Combinată cu analiza mutațională și cartografierea fizică, genomica comparativă oferă o metodă puternică pentru legarea secvențelor de ADN de boli umane complexe.

26. Problema aici este dacă organismul pe care îl luăm în considerare este independent și se autoreplică. Se pare că numărul minim de gene pentru un organism capabil să trăiască autonom este cuprins între 250 și 350. Simbiontii pot avea genomuri mult mai mici și mai puține gene datorită materialelor furnizate de celula gazdă. Atâta timp cât definim fără echivoc stilul de viață (autonom sau simbiotic) al organismului în cauză, este interesant de luat în considerare câte gene sunt necesare pentru a îndeplini sarcina de a „trăi".

Capitolul 22

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

22.1 Antigenele sunt de obicei molecule destul de mari, iar în timpul digestiei acestea sunt uneori descompuse în molecule mai mici , ceea ce le face ineficiente în stimularea sistemului imunitar. Unele persoane sunt alergice la alimentele pe care le consumă, ceea ce demonstrează că nu toate antigenele sunt degradate sau modificate în timpul digestiei. În unele cazuri, antigenele ingerate stimulează sistemul imunitar (vaccinul oral antipoliomielitic) și oferă o cale de comunicare. Ocazional, imunitatea localizată (intestinală) poate fi stimulată prin administrarea orală de antigene, iar în unele cazuri acest lucru poate oferi imunitate împotriva agenților patogeni ingerați .

22.2 rezistența la glifosat la plantele de cultură, a fost creată o genă de fuziune care a introdus un promotor viral pentru a controla gena EPSP sintazei. Produsul de fuziune a fost inserat în vectorul Ti și transferat la A. *tumifaciens,* care a fost utilizat pentru a infecta celulele plantelor. Calusurile au fost selectate în funcție de rezistența lor la glifosat. Ulterior , calusurile rezistente au fost dezvoltate în plante transgenice. Există o mică posibilitate ca unul dintre aceste „accidente" precum cel sugerat în întrebare să se poată produce. Cu toate acestea, analizând pașii care au trebuit parcurși pentru a genera prima plantă rezistentă, pare mai probabil ca o astfel de trăsătură să nu poată „scăpa" din plantă; mai degrabă, A. *tumifaciens modificat* ar putea scăpa, infecta și transfera rezistența la glifosat la speciile de insecte.

22.3 Copilul în cauză este purtător al deleției genei β3-globinei, la fel ca și părinții săi. Prin urmare, genotipul său este

22.4 Hibridizează prin complementare de baze cu secvența normală de ADN .

22.5 (a, b) Una dintre principalele probleme ale terapiei genice Scopul este de a livra virusul dorit către țesutul țintă în mod eficient. Unele dintre problemele ridicate de utilizarea vectorilor retrovirali sunt următoarele : (1) Integrarea în gazdă trebuie să fie specifică celulei pentru a evita deteriorarea celulelor neținte. (2) Integrarea retrovirală în genomurile celulelor gazdă are loc numai dacă celula gazdă se replică. (3) Inserția genomului viral poate influența alte gene decât gena țintă, dar care sunt esențiale . (4) Genomurile retrovirale au o capacitate de clonare scăzută și nu pot purta secvențe inserate mari , în timp ce multe gene umane sunt mari . (5) Există posibilitatea ca recombinarea cu virusurile gazdă să producă un virus infecțios dăunător .

(c) De fapt, ar fi mai eficient (deși poate mai dificil din punct de vedere tehnic) să se modifice țesutul germinal , deoarece odată ce această lucrare este efectuată într -o familie, boala ar fi eliminată. Cu toate acestea , există probleme etice considerabile asociate cu terapia germinală . Reamintim propunerile anterioare ale mișcării eugenice de acum multe decenii , care susțineau utilizarea reproducerii selective pentru purificarea rasei umane . Unii biologi de astăzi au respins public terapiile genice germinale .

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Există îngrijorări cu privire la faptul dacă culturile și alimentele modificate genetic vor fi supuse testelor necesare pentru alergenicitate, impact asupra mediului și potențialul de polenizare încrucișată, care ar putea duce la contaminarea speciilor native. Dacă anumite culturi devin standard și sunt controlate de câțiva producători, este probabil ca variabilitatea genetică globală să fie redusă . Această îngrijorare ar fi sporită dacă astfel de culturi ar conține în mod obișnuit markeri genetici pentru rezistența la antibiotice și gene care conferă toxicitate dăunătorilor. O îngrijorare mai largă este că proiectarea și brevetarea culturilor ar putea duce la dominarea aprovizionării globale cu alimente de către câteva companii.

4. O metodă implică utilizarea secvenței de aminoacizi a proteinei pentru a produce gena sintetic. Alternativ , deoarece intronii sunt scindați din pre-ARNm în timpul maturării sale , dacă se poate obține ARNm, acesta ar putea fi utilizat pentru a produce ADN (ADNc) folosind transcriptază inversă . ADNc-ul rezultat ar putea fi apoi utilizat (fără introni) pentru a fabrica produsul dorit.

6. În general, bacteriile nu procesează proteinele eucariote în același mod ca eucariotele. Eucariotele transgenice sunt mai predispuse să proceseze corect proteinele eucariote, crescând astfel probabilitatea ca acestea să aibă o activitate biologică normală.

8. (a) Atât extracțiile saline, cât și cele pe coloană cu Lkt 50 par să poată induce o neutralizare a toxicității de cel puțin 50% atunci când sunt injectate la iepuri.
   (b) În primul rând, imunogenul trebuie să fie încorporat stabil în materialul genetic al plantei gazdă , iar planta trebuie să exprime doar acel imunogen. În timpul ingerării, imunogenul trebuie să treacă prin peretele intestinal nemodificat sau modificat în așa fel încât să stimuleze răspunsul imun dorit. Trebuie să se asigure că nu se produc produse secundare potențial toxice ale transgenezei . Cu alte cuvinte, trebuie abordate problemele ecologice și de mediu generale pentru a preveni ca o plantă transgenică să devină un vector nedorit care dăunează mediului sau oricărui organism care ingerează planta (direct sau indirect).
10. Chiar dacă am dezvoltat o metodă pentru a detecta șapte dintre mutațiile descrise, este posibil să apară rezultate negative în ciuda faptului că individul este purtător al genei fibrozei chistice. Cu alte cuvinte, sondele specifice (sau oligonucleotidele specifice alelelor) care au fost dezvoltate nu sunt neapărat utile pentru detectarea tuturor alelelor mutante. În plus, ar trebui luată în considerare rentabilitatea acestui screening propus la nivelul întregii populații .
12. Deoarece ambele mutații apar în gena fibrozei chistice , copiii care posedă ambele alele vor avea boala. Având în vedere că ambii părinți sunt heterozigoți, fiecare copil născut va avea o probabilitate de 25% de a dezvolta fibroză chistică.
14. Utilizarea analizei enzimelor de restricție pentru detectarea mutațiilor punctuale la oameni este un proces foarte anevoios, bazat pe încercări și erori. Având în vedere dimensiunea genomului uman în ceea ce privește secvențele de baze și numărul relativ mic de enzime de restricție distincte, probabilitatea de a găsi o mutație punctuală specifică, separată de alte variații normale ale secvenței, într-o genă dorită este scăzută.
16. Ca în cazul tuturor terapiilor, vindecarea trebuie să fie mai puțin dăunătoare decât boala. În cazul terapiei genice mediate de virus , antigenitatea virusului nu trebuie să interfereze cu sistemul de administrare; o astfel de antigenitate poate declanșa inflamație sau răspunsuri imune mai severe. Combaterea răspunsului imun al gazdei poate necesita utilizarea de medicamente imunosupresoare sau modificarea vectorului. Una dintre probleme este durata expresiei genice dorite la locul afectat de boală. Expresia de scurtă durată poate necesita expunere repetată la vector, ceea ce poate duce la răspunsuri nedorite. Pentru unele boli, terapia genică locală prin inhalare sau injectare poate produce mai puține efecte secundare decât expunerea sistemică. Adenovirusurile pot părea deosebit de utile pentru terapia genică, deoarece pot infecta celule care nu se divid și pot accepta cantități relativ mari de ADN suplimentar (30 kb sau mai mult).
18. Deși s- au obținut unele succese cu terapia genică , rămân multe întrebări. În primul rând , vectorii care livrează gena dorită nu trebuie să provoace reacții adverse. În al doilea rând, integrarea unor vectori depinde în prezent de replicarea ADN-ului în gazdă. Prin urmare, nu toate celulele din organism sunt disponibile pentru integrarea cu anumiți vectori. În al treilea rând , trebuie realizată o integrare precisă cu ținta pentru a reduce introducerea de noi mutații. În al patrulea rând , majoritatea genelor umane sunt mari , în timp ce mulți dintre vectorii utilizați astăzi pot purta doar inserturi scurte . Vectorii capabili să poarte inserturi mai lungi vor fi necesari dacă dorim să avem la dispoziție o gamă largă de terapii. În cele din urmă, produsele vectoriale dorite trebuie să aibă efecte de lungă durată, iar vectorii înșiși nu trebuie să poată reveni la starea virală infecțioasă.
20. p53 și pRB sunt proteine supresoare tumorale și sunt necesare pentru ca celula să își controleze eficient ciclul celular . Reducerea activității lor ar afecta controlul normal al ciclului celular și ar duce foarte probabil la cancer. Acest lucru ar fi deosebit de important dacă acești vectori virali ar fi utilizați pentru tratarea cancerului , în care ciclul celular este probabil deja compromis .
22. Cele două probleme principale descrise aici sunt întrebări destul de frecvente în ingineria genetică . Prima este localizarea ADN -ului introdus în țesutul țintă și poziția sa dorită în genom. Direcționarea necorespunzătoare poate avea consecințe grave . În plus, este adesea dificil să se controleze răspunsul ADN -ului introdus. Reglarea genelor este complexă și supusă diverșilor factori, inclusiv semnalelor în amonte și în aval , precum și diverselor scheme de procesare post -transcripțională . Controlul artificial al tuturor acestor factori se va dovedi dificil.
24. Având în vedere utilizarea testelor genetice și natura lor extrem de personală , se pare că reglementarea guvernamentală ar fi o modalitate de a reduce distribuirea informațiilor incorecte care pot avea o mare importanță pentru indivizi și familii.
26. *Dimensiunea eșantionului :* Este dimensiunea eșantionului suficient de mare pentru a minimiza corelațiile false ? Factori epigenetici *:* Întrucât genomul este puternic influențat de factorii epigenetici , cum ar putea aceștia să influențeze un studiu bazat pe polimorfisme SNP? *Factori de mediu* : Au fost probele colectate în așa fel încât să se asigure că nu există diferențe semnificative în expunerea la factori de mediu ? *Context* genetic *:* Întrucât nu se compară întregul genom , ce supresoare și/sau modificatori există și nu au fost luați în considerare, al căror efect este de a masca sau intensifica expresia anumitor gene ? Ce proprietăți emergente există *în* arhitectura alelică generală? *Stratificarea populației :* Ar putea exista diferențe în ceea ce privește frecvența alelică caracteristică populației studiate în comparație

cu grupul de control? Astfel de diferențe în frecvențele populației pot rezulta din origini etnice diferite, în funcție de componența grupurilor de studiu și de control.

28. Există mai multe motive pentru care șoarecii cu fibroză chistică pot să nu prezinte simptome respiratorii similare cu cele umane. În primul rând, distribuția tipurilor de celule, prezența CFTR și canalele de clorură/sodiu diferă în tractul respirator superior și inferior al șoarecilor și oamenilor. În al doilea rând, șoarecii tind să nu sufere de infecții bacteriene respiratorii, care, totuși , influențează semnificativ patologia umană. O analiză cuprinzătoare a acestui subiect poate fi găsită în Grubb și Boucher, 1999 *Physiological Reviews,* vol. 71, 5193-5214.

Capitolul 23

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

23.1 (a) Încrucât 1/256 dintre plantele $F_{2\ au}$ o înălțime de 20 cm și 1/256 din 40 cm, trebuie să existe patru perechi de gene implicate în determinarea dimensiunii florii.

(b) Având în vedere că există nouă dimensiuni, s-ar putea răspunde la următoarea ecuație:

AaBbCcDd X *AABBCCDD*

Distribuția de frecvență a crossover-ului ar fi:

1/16 = 40 cm
4/16 = 37,5 cm 6/16 = 35 cm 4/16 = 32,5 cm
1/16 = 30 cm

23.2 (a) Luând suma valorilor și împărțind-o la

Din numărul de eșantioane se obțin următoarele medii:

Lungimea medie a fibrei = 7,7 cm
Greutatea medie a lânii = 6,4 kg

Varianța pentru fiecare personaj este:

Variația lungimii fibrei = 6,097
Variația greutății lânii = 3,12

Abaterea standard este rădăcina pătrată a variației :

Lungimea fibrei — 2.469
Greutatea lânii — 1.766

(b, c) Covarianța pentru cele două caractere este egală cu 30,36/7, adică 4,34, în timp ce coeficientul de corelație este +0,998.

(d) corelație foarte mare între greutatea lânii și lungimea fibrei și este foarte probabil ca această corelație să nu fie accidentală. Deși corelația nu este sinonimă cu cauza și efectul, pare logic să credem că, dacă lungimea fibrei crește, crește și greutatea lânii. Prin urmare, este destul de sigur să spunem că creșterea greutății lânii este direct legată de creșterea lungimii fibrei.

23.3 *Gemenii monozigoți* se dezvoltă dintr -un singur ovul fertilizat și, prin urmare, sunt identici genetic. Aceștia oferă o metodă pentru determinarea influenței factorilor genetici și de mediu asupra anumitor trăsături. *Gemenii dizigoți* se dezvoltă din două ovule fertilizate de spermatozoizi separați. Rolul factorilor genetici și de mediu poate fi studiat prin compararea expresiei trăsăturilor la gemenii monozigoți și dizigoți.

O rată de concordanță mai mare pentru gemenii monozigoți comparativ cu gemenii dizigoți indică o componentă genetică semnificativă pentru o anumită trăsătură. Rețineți că pentru trăsături precum grupa sanguină , culoarea ochilor și dizabilitatea intelectuală , există o diferență semnificativă între grupele sanguine MZ și DZ. Cu toate acestea, pentru rujeolă , diferența nu este la fel de semnificativă, sugerând un rol mai important al mediului. Culoarea părului are o componentă genetică semnificativă, la fel ca și epilepsia idiopatică , schizofrenia, diabetul, alergiile, buza left și piciorul strâmb . Componenta genetică a cancerului de sân este prezentă, dar minimă, conform acestor date.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. În variația discontinuă , influențele fiecărei perechi de gene sunt neaditive , rezultând rapoarte mendeliene mai tipice, cum ar fi 9:3:3:1 și 3:1. În variația continuă , perechile de gene *interacționează* (de obicei aditiv) pentru a produce un fenotip a cărui distribuție este mai puțin „în trepte". Moștenirea sistemelor poligenice urmează o distribuție mai continuă.

4. (a) Încrucât a fost identificat un rezultat dihibrid, există două loci implicate în producerea culorii. Există două alele la fiecare locus, rezultând un total de patru alele.

(b, c) Încrucât descrierile roșului, roșului intermediar etc. nu ne oferă nicio indicație a cantității *de* culoare în niciun fel de unități, nu putem cuantifica de fapt o cantitate unitară pentru fiecare schimbare de culoare. Am putea afirma că fiecare genă (alelă aditivă) oferă o cantitate unitară egală cu fenotipul și că culorile diferă unele de altele în multipli ai acelei cantități unitare. Numărul de alele aditive necesare pentru a produce fiecare fenotip ar fi atunci

siguiente:

1/16 = rojo oscuro = *AABB*
4/16 = rojo oscuro intermedio = *2AABb* 2AaBB
6/16 = rojo intermedio — *AAbb 4AaBb* aaBB
4/16 = rojo claro = *2aaBb* *2Aabb*
1/16 = blanco = *aabb*

(d) Fj = tot roșu deschis
F2 = 1/4 roșu mediu
2/4 roșu deschis
1/4 alb

6. (a, b) Rețineți că atunci când patru perechi de gene acționează aditiv, proporția unuia dintre fenotipurile extreme față de numărul total de urmași este 1/256. Același lucru se poate spune și despre celălalt tip extrem. Tipurile extreme din această problemă sunt plantele de 12 cm și 36 cm . Din această observație, s-ar putea sugera că sunt implicate patru perechi de gene .

(c) Dacă există patru perechi de gene, există nouă clase fenotipice *(2n* + 1) și opt trepte între aceste clase. Deoarece există o diferență de 24 cm între extreme, fiecare treaptă reprezintă 24 cm/8 = 3 cm (fiecare dintre aditivi).

(d) Încrucișat părinții sunt consangvinizați, se așteaptă ca ei să fie complet homozigoți. De exemplu:

AABBccdd X *aabbCCDD*

(e) Încrucișat genotipul *aabbccdd* are ca rezultat o înălțime de 12 cm și fiecare alelă scrisă cu majusculă adaugă 3 cm la înălțime, există multe posibilități pentru o plantă de 18 cm :

AAbbccdd
AaBbcdd aaBbCcdd, etc.

Orice plantă cu șapte litere majuscule va avea, de exemplu , 33 cm înălțime.

AABBCCDd,
AABBCcDD, AABbCCDD

8. În ceea ce privește înălțimea, rețineți că diferențele medii dintre gemenii MZ crescuți împreună (1,7 cm) și gemenii MZ crescuți separat (1,8 cm) sunt similare (indicând influențe mici ale mediului) și considerabil mai mici decât diferențele dintre gemenii DZ (4,4 cm) sau orice frați (4,5 cm) crescuți împreună. Aceste date indică faptul că genetica joacă un rol crucial în determinarea înălțimii .

Totuși , în ceea ce privește greutatea , rețineți că gemenii MZ prezintă diferențe mult mai mici (1,9 kg) decât gemenii MZ crescuți separat, ceea ce indică faptul că mediul are un impact considerabil asupra greutății . Comparând diferențele de greutate dintre gemenii MZ crescuți separat și gemenii DZ și orice frați și surori crescuți împreună, se poate concluziona că mediul are aproape la fel de multă influență asupra greutății ca și genetica .

În ceea ce privește numărul de creste , diferențele dintre gemenii MZ crescuți împreună și cei crescuți separat sunt mici. Din datele din tabel , se pare că numărul de creste și înălțimea au cele mai mari valori de ereditabilitate.

10. Multe trăsături, în special cele pe care le percepem ca fiind cantitative, sunt probabil determinate poligenic , cu posibile influențe de mediu. Exemple comune includ înălțimea; structura generală a corpului; culoarea pielii ; și probabil cele mai comune trăsături comportamentale, inclusiv inteligența .

12. (a) Pentru grăsimea de șold :

Heritabilitate în sens larg = H2 = 12,2 /30,6 = 0,398 *Heritabilitate în sens restrâns = h1* = 8,44/30,6 = 0,276

lungimea corpului

Eritabilitate în sens larg = ^{H2} = 26,4/52,4 = *0,504 Eritabilitate strictă* = h^2 = 1 1,7/52,4 = 0,223

(b) Selectarea grăsimii de pe șold ar produce un răspuns mai puternic .

14. (a) Pentru vitamina A: h_A^2 = 0,097 Pentru $_{colesterol}$: *hA2* = ^{0,223}

(b) Conținutul de colesterol ar fi influențat în mare măsură de selecție.

16. *h2* = (7,5 - 8,5/6, 0 - 8,5) = 0,4 (ereditabilitate realizată)

18. h^2 - 0,3 = ($_{M^2}$ - 60/80 - 60)
M² = $_{66}$ grame

20. (a, b) În multe cazuri, o trăsătură poate fi grupată în familii, însă procedurile tradiționale de cartografiere pot să nu fie aplicabile deoarece trăsătura poate fi influențată de mai multe gene. În general , cercetătorii caută asocieri cu anumite secvențe de ADN (markeri moleculari). Atunci când o trăsătură se cosegregă cu un marker specific și acel marker este asociat statistic cu trăsătura , este probabil să fi fost identificat un QTL . Markeri precum RFLP-uri, SNP-uri și microsateliți sunt adesea utilizați deoarece sunt foarte variabili, relativ ușor de evaluat și prezenți la toți indivizii .

22. (a) Există două modalități de a răspunde la această întrebare: o metodă complexă și o metodă simplă . În prima variantă, ar fi necesar să se ia o foaie mare de hârtie, să se efectueze crucea *(AaBbCcDdEeFf* X *AaBbCcDdEeFf),* Colectați genotipurile și calculați proporțiile .

Această metodă este laborioasă și predispusă la erori. Pe de altă parte, cea mai simplă metodă ar fi să recitiți materialul despre expansiunea binomială și să observați modelul care precede fiecare expresie. Rețineți că toate numerele, altele decât 1, sunt egale cu suma celor două numere aflate direct deasupra lor . Extinderea numerelor pentru a include șase perechi de gene dă cele 13 clase și frecvențele acestora :

3 cm = 1,4 cm = 1,25 cm = 66
6 cm = 220 , 7 cm = 495 , 8 cm = 792
9 cm = 924 10cm = 792 1 1 cm= 495
12 cm = 220 , 13 cm = 66 , 14 cm = 12
15 cm = 1

Pentru a verifica calculele , asigurați-vă că frecvențele totale sunt 4.096 . De asemenea, rețineți o scurtătură suplimentară : deoarece distribuția este simetrică, trebuie să calculați doar până la valoarea centrală , iar restul va fi la fel, în ordine inversă.

(b) Pentru a determina rezultatul unei încrucișări a plantelor F) în încrucișarea de testare, se aplică formula care permite calcularea oricărui set de componente: n!/(s!t!), unde *n* — numărul total de evenimente (6), *s* =■ numărul de evenimente cu rezultatul *a* și *t* = *numărul de evenimente* cu rezultatul *b.* De exemplu, pentru a determina câte plante cu înălțimea de 6 cm s-ar obține din încrucișarea *AaBbCcDdEeFf* X *aabbccddeeff,* ceea ce trebuie de fapt să determinăm este câte vor avea trei alele aditive (litere majuscule) și trei alele neaditive (litere minuscule).

$$6!/(3!3!) = 20$$

Aplicând această formulă se obțin următoarele frecvențe :

3 cm = 1, 4 cm = 6 , 5 cm = 15, 6 cm = 20, 7 cm = 15, 8 cm = 6, 9 cm = 1

Totalul este egal cu 64. Puteți verifica raționamentul considerând că ar trebui să existe doar 1/64 fără alelă aditivă (3 cm) și 1/64 cu toate alelele aditive (9 cm).

24. Ca în cazul multor trăsături care se datorează mai multor loci care acționează aditiv, unele gene au o influență mai mare asupra expresiei decât altele. În plus, factorii de mediu pot juca un rol în exprimarea unor trăsături poligenice. În cazul brahidactiliei, există numeroase gene modificatoare în genom care pot influența expresia brahidactiliei. Pentru informații despre acest aspect, consultați OMIM *(Online Mendelian Inheritance of Man)* la http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ .

26. Cu cât variația genetică este mai mare la o specie, cu atât răspunsul la selecție va fi mai probabil și mai dramatic. Prin urmare, este de așteptat un răspuns excelent la selecție în populația sălbatică.

28. Crescătorii încearcă să elimine această anomalie prin „selecție", menținând mai întâi o evidență completă și detaliată a raselor afectate. În al doilea rând, evită reproducerea câinilor ale căror rude apropiate sunt afectate. Mecanismele moleculare de dezvoltare care dau naștere efectului „lunii de naștere" în displazia de șold canină sunt necunoscute. Cu toate acestea, în multe, și poate chiar toate, trăsăturile cantitative, este clar că există o influență semnificativă a mediului atât asupra penetrării, cât și asupra expresiei fenotipului. Atunci când multe gene acționează în diferite moduri pentru a influența fenotipul , există oportunități pentru micromedii moleculare și de dezvoltare variate în cadrul organismului. Cu alte cuvinte, cu cât distanța moleculară de la genom la fenotip este mai mare și mai complexă, cu atât este mai mare probabilitatea ca factorii de mediu să fie implicați în exprimarea acestuia.

Capitolul 24

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

24.1 Dacă putem selecta tulpini consangvinizate pentru un anumit comportament, va fi posibil să analizăm caracteristicile moleculare și fiziologice care diferă de cele ale șoarecilor normali . Similar analizei mutațiilor , tulpinile consangvinizate oferă o oportunitate pentru studii comparative. Este posibil să se examineze diferențele de fiziologie , metabolism și toleranță la alcool . În plus , aceasta deschide calea către studii detaliate ale factorilor cunoscuți (receptori etc.) legați de dependență . Odată ce genele principale sunt localizate (în acest caz, prin analiza QTL), pot fi studiate genele, reglarea lor și produsele lor. Această abordare moleculară oferă o oportunitate de a determina diferențele precise dintre starea normală și cea de dependență . Ambele abordări pot oferi informații despre natura trăsăturilor comportamentale și , având în vedere complexitatea majorității comportamentelor , ambele abordări sunt adesea necesare.

24.2 Una dintre cele mai ușoare metode de a determina dacă există o bază genetică pentru o anumită anomalie este încrucișarea muscii anormale cu o muscă normală . Dacă trăsătura este determinată de o genă dominantă , acea trăsătură va apărea la urmași - probabil la jumătate dintre urmași dacă gena era în stare heterozigotă. Dacă gena este recesivă și homozigotă, atunci este posibil să nu fie exprimată la urmașii primei încrucișări. Cu toate acestea, dacă generația F1 este încrucișată , ea poate apărea la aproximativ un sfert dintre urmași . Astfel de proporții nu ar fi de așteptat dacă trăsătura ar fi poligenică, deoarece acest lucru introduce complexități în orice studiu. Modificări ale acestor modele ar fi de așteptat dacă modul de moștenire ar fi legat de X sau ar prezenta alte modificări ale proporțiilor mendeliene tipice . Se poate emite ipoteza că trăsătura influențează sistemele nervos , cuticular sau muscular.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. O metodă, abordarea analizei comportamentale , încearcă să coreleze - diferențele comportamentale existente cu diferențele genetice generale . Este o abordare comparativă în care un anumit comportament este examinat la mai multe (sau multe) tulpini de organisme strâns înrudite, dar distincte genetic . Dacă mediul este menținut constant și diferențele comportamentale persistă , înseamnă că există o componentă genetică a comportamentului. O a doua tehnică implică selecția genetică a anumitor comportamente. Atunci când selecția și reproducerea pentru un anumit comportament duc la un fenotip consistent, atunci se poate examina genetica comportamentală . O a treia metodă profită de faptul că unele comportamente sunt puternic influențate de un locus major . În abordarea analizei genelor, mutagenii pot fi utilizați pentru a induce mutații care pot fi utilizate pentru a studia comportamentele de interes . Dacă o mutație indusă produce o schimbare comportamentală consistentă , aceasta este adesea cea mai ușoară modalitate de a analiza comportamentul. Ultimele două metode pot fi utilizate numai dacă organismul de interes poate fi manipulat genetic , ceea ce nu este întotdeauna posibil (așa cum este

cazul primatelor). În plus, odată ce tehnicile de selecție și mutație au fost aplicate, expresia naturală a majorității comportamentelor va fi modificată. Din punct de vedere pozitiv, analizele de mutație și selecție oferă oportunități unice de a examina factorii genetici și fiziologici la nivel molecular.

4. O limitare a acestei abordări este intensitatea efortului necesar pentru a crea tulpini genetic uniforme care reflectă un comportament specific. O altă dificultate este că genele îndeplinesc adesea funcții multiple sau pot funcționa diferit în diferite tulpini și/sau medii. În plus, deoarece geotaxia este o trăsătură complexă, experimentele de selecție oferă puține indicații despre numărul și locația genelor selectate. Noile tehnologii, inclusiv cipurile ADN, au fost aplicate acestei probleme, permițând analiza simultană a modelelor de expresie ale mai multor gene. Tulpinile care prezintă răspunsuri ridicate și scăzute la selecția geotactică au arătat diferențe reproductibile în expresia genelor și au relevat unele dintre caracteristicile moleculare și fiziologice ale geotaxiei. Cu toate acestea, este important de subliniat faptul că asocierea unui anumit model de cip ADN cu un comportament specific nu indică neapărat o relație cauză-efect. Unele gene care au puțină sau nimic de-a face cu geotaxia pot avea pur și simplu o relație coincidentă cu gene care au o influență geotactică.

6. Datorită rigidității dezvoltării la *Caenorhabditis* și a cunoștințelor vaste despre destinul și conectivitatea celulară, aceasta reprezintă un organism experimental excelent pentru studiul dezvoltării. În plus, datorită destinului său fix, celulele pot fi modificate fizic și/sau genetic pentru a studia - dezvoltarea și comportamentul rezultate. Cu toate acestea, repertoriul comportamental al C. *elegans* este oarecum limitat. În plus, C. *elegans* are mai multe gene care codifică proteine decât *Drosophila,* un alt organism a cărui genetică comportamentală a fost studiată pe larg. Acest număr suplimentar de gene care codifică proteine, împreună cu un repertoriu comportamental mai mic, reprezintă un dezavantaj atunci când se utilizează C. *elegans*.

8. Printre problemele care limitează studiul comportamentului uman putem cita următoarele:
   (a) Cu un număr relativ mic de urmași per împerechere, metodele genetice standard sunt complicate.
   (b) Este dificil să obții înregistrări despre bolile familiale , în special despre bolile comportamentale.
   (c) Timpul lung de generație îngreunează studiile longitudinale .
   (d) Oamenii de știință nu pot controla împerecherea.
   (e) Există limite ale tratamentelor experimentale care pot fi aplicate.
   (f) Caracteristicile pe care cineva este interesat să le studieze sunt de obicei complexe și dificil de cuantificat.
   (g) Contextul cultural și familial poate influența foarte mult comportamentul.

10. Mutațiile recesive sunt de obicei observate doar la nivel fenotipic la indivizii homozigoți. Autofertilizarea , cea mai extremă formă de consangvinizare , crește considerabil probabilitatea ca genele recesive să devină homozigote . Tulpinile homozigote sunt mai avantajoase atunci când se studiază trăsături complexe .

12. Expresia genelor poate fi comparată, folosind analiza cipurilor ADN, între mușchii crescute în spațiu și o populație de control de pe Pământ. Prin compararea ritualurilor comportamentale (metabolice, de împerechere, de hrănire, de rătăcire , de zbor) între cele două populații (spațiu și Pământ), profilurile de expresie genică pot fi corelate și se pot determina genele cel mai probabil asociate cu fiecare modificare comportamentală . Deși ar fi interesant să se studieze o serie de parametri în acest fel , ne putem concentra pe studierea genelor despre care se știe că influențează funcția musculară și nervoasă la muște și la oameni. Un al doilea studiu s-ar putea concentra asupra sistemului imunitar, deoarece se știe că există corelații genetice surprinzător de mari între răspunsul imun al muștelor și al mamiferelor (Hoffmann, 2003). Întrucât știm că microgravitația afectează negativ sistemul imunitar uman (reducând activitatea mitogenă a celulelor T), ar fi util să se compare și profilurile de expresie genică ale sistemului de răspuns imun. Latura comportamentală a experimentului s-ar concentra pe determinarea dacă modificările forței gravitaționale modifică comportamentul (inactivitate , utilizarea mușchilor și a nervilor) până la punctul în care răspunsul imun este afectat . Combinarea celor două studii — profilurile de expresie genică asociate cu comportamentul și răspunsul imun — ar putea oferi informații despre o serie de probleme importante pe care oamenii le întâmpină în zborurile spațiale , justificând astfel cercetarea și făcând- o relativ ieftină .

14. Studiile de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) utilizează milioane de SNP-uri în încercarea de a găsi asocieri cu o anumită trăsătură, cum ar fi schizofrenia. Astfel de studii indică faptul că nu există o singură genă sau alelă care să contribuie decisiv la această boală.

16. Datele din tabel indică faptul că femelele *(Gasterosteus aculeatus)* petrec mai mult timp cu masculii care au constituția MHC optimă decât cu cei care nu o au . Ca și în cazul altor organisme, se pare că diversitatea genetică a MHC este un avantaj selectiv . Deoarece există funcții imunologice asociate cu complexul MHC, mecanismele de selecție a partenerului care susțin menținerea unei astfel de diversități par rezonabile dintr -o perspectivă evoluționistă .

Capitolul 25

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta”

25.1

q - 0,544 p - 0,456

Frecvențele genotipurilor sunt determinate prin aplicarea formulei $p^2 + 2pq + q^2$ după cum urmează:

Frecvența AA = 0,208 sau 20,8% Frecvența *Aa* = 0,496 sau 49,6% Frecvența *aa* = 0,296 sau 29,6%

25.2 (a) q este 0,01
(b) $p = 1 - q$ sau 0,99
(c) $2pq = 2(0,01)(0,99) = 0,0198$ (sau aproximativ 1/50)
(d) $2pq \times 2pq = 0,0198 \times 0,0198 = 0,000392$ sau aproximativ 1/255

25.3 Probabilitatea totală ca cuplul să aibă un copil cu fibroză chistică este 98/2.500 X 2/3 X 1/4 = 0,00653, sau aproximativ 1/153.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. Din cauza degenerării codului genetic, unele substituții de nucleotide, în special la a treia bază, nu modifică aminoacizii. În plus, dacă nu există nicio modificare a sarcinii generale a proteinei, este puțin probabil ca electroforeza să separe variantele. Dacă un aminoacid încărcat pozitiv este substituit cu un alt aminoacid cu aceeași sarcină, sarcina totală a proteinei rămâne neschimbată. Același lucru este valabil și pentru alte substituții de aminoacizi neutri și aminoacizi încărcați negativ.

4. Există multe secțiuni de ADN într-un genom eucariot care nu se reflectă într-un produs proteic. De fapt, există multe secțiuni de ADN care nici măcar nu sunt transcrise și/sau nu au niciun rol fiziologic aparent. Astfel de regiuni sunt mai predispuse să tolereze modificări ale nucleotidelor în comparație cu regiunile care au în mod necesar un impact fiziologic. Intronii, de exemplu, prezintă variații de secvență care nu se reflectă într-un produs proteic. Exonii, pe de altă parte, codifică produse care sunt de obicei implicate în producerea unui fenotip și, prin urmare, sunt supuse unei presiuni selective.

6. Pentru fiecare dintre aceste valori, este suficient să calculați rădăcina pătrată pentru a calcula q, apoi să calculați p și în final să înlocuiți valorile în expresia $2pq$.
(a) $q = 0,08$; $2pq = 2(0,92)(0,08) = 0,1472$ sau 14,72%
(b) $q = 0,009$; $2pq = 2(0,991)(0,009) = 0,01784$ sau 1,78%
(c) $q = 0,3$; $2pq = 2(0,7)(0,3) = 0,42$ sau 42%
(d) $q = 0,1$; $2pq = 2(0,9)(0,l) = 0,18$ sau 18%
(e) $q = 0,316$; $2pq = 2(0,684)(0,316) = 0,4323$ sau 43,23% (În funcție de modul în care sunt rotunjite zecimalele, se pot obține răspunsuri ușor diferite.)

8. Presupunând că populația se află în echilibru Hardy-Weinberg, dacă avem frecvența indivizilor cu fenotipul dominant, restul trebuie să aibă fenotipul recesiv (q^2) . Cunoscând q^2 , *putem calcula* q , iar din această valoare deducem p. Aplicând expresia $p^2 + 2pq + q^2$. putem rezolva problema.

10,5 procente.

12. Ecuația generală pentru a răspunde la această întrebare este

$$\text{în} = \text{Í./U} + \text{n?}_{\text{„}})$$

unde n = numărul de generații, q_p = frecvența genetică inițială și q_n = frecvență genetică nouă.

14. Frecvența heterozigotă este 2pq sau aproximativ *0,02* , așa cum se menționează în problemă. Probabilitatea ca unul dintre bunici să fie heterozigot va fi , prin urmare, 0,02 + 0,02, adică 0,04 sau 1/25. *(Notă:* Dacă luăm în considerare probabilitatea ca ambii părinți să fie purtători , 0,02 x 0,02, răspunsul va fi ușor diferit.) Dacă unul dintre bunici este purtător, atunci probabilitatea ca urmașii unei căsătorii între veri primari să fie homozigoți pentru gena recesivă va fi de 1/16. Înmulțind cele două probabilități, avem 1/16 x 1/25 = 1/400.

(a) n = 1 = 0,33 *Pn* = 0,67
(b) n = 5 9n = 0,143 $p_{\text{„}}$ = 0,857
(c) n = 10 q_n = 0,083 *Pn* " 0,917
(d) n = 25 « 0,037 *Pn* = 0,963
(e) n = 100 q_n = 0,0098 *Pn* = 0,9902
(0 n = 1.000 $q_n = 0,00099$ $p_n = 0,99901$

Aplicând aceeași analiză unei căsătorii între veri de gradul doi , obținem 1/64 X 1/25 = 1/1.600. Rețineți că în populația generală există o frecvență a homozigoților de 1/10.000; prin urmare , putem observa cu ușurință cum consangvinitatea crește probabilitatea homozigoției.

16. 2/100.000 sau 2 x $10^{\text{'s}}$.

18. Mecanismele de izolare reproductivă sunt grupate în precopulatorii și postcopulatorii și includ următoarele:
- geografic sau ecologic
- sezonier sau temporar
- comportamental
- mecanică
- fiziologic
- neviabilitatea sau slăbiciunea hibrizilor
- sterilitatea în dezvoltarea hibrizilor
- sterilitatea segregațională a hibrizilor
- Colapsul F2

20. Teoria neutră a evoluției moleculare ia în considerare posibilitatea ca unele mutații să fie funcțional echivalente cu alelele pe care le înlocuiesc. În general, frecvența alelelor neutre într -o populație este determinată de ratele de mutație , derivă genetică aleatorie și selecție naturală .

22. $F=(H_e - H_0)/H_e$
$F = (38.475 - 20)/38.475 = 0,48$

24. $F = (H_e - H_0)/H_e$
$F = (0,375 - 0,34)/0,375 = 0,093$

Această problemă ar putea fi rezolvată și folosind numărul real de mufloni din fiecare categorie, unde s-ar aștepta o medie de 18,75 heterozigoți (2p<j)(50) :

$$F = (18,75 - 17)/18,75 = 0,093$$

26. (a) Gena este cel mai probabil recesivă, deoarece toți indivizii afectați au părinți neafectați, iar tulburarea are în mod clar un caracter familial. Pentru populație , deoarece $q^2 = {}^{0,002}$, atunci q = 0,045, *p = 0,955 și 2(pq*) = 0,086. Pentru comunitate, deoarece q^2 = 0,005, atunci *q* = 0,07, *p* = 0,93 și 2(pq) = 0,13.

(b) Probabil că aici este la lucru „efectul fondator". Populațiile locale relativ mici, care sunt relativ izolate din punct de vedere reproductiv, tind să prezinte diferențe în frecvențele genetice în comparație cu populațiile mai mari. În aceste populații mici, homozigoția crește deoarece o genă are o șansă mai mare de a se „întâlni cu ea însăși".

apare un blocaj populațional și numărul de reproducători eficienți scade, au loc de obicei două fenomene. În primul rând, deoarece populația este mică, există fluctuații mari ale frecvențelor genotipurilor, dezvăluind alele dăunătoare din pură întâmplare. În al doilea rând, consangvinitatea apare adesea în populații mici, crescând probabilitatea de homozigoție. Odată cu creșterea homozigoției vine și o probabilitate crescută de exprimare a alelelor recesive. Deoarece multe gene care cauzează boli sunt recesive, o creștere a bolilor genetice este una dintre consecințele probabile ale unui blocaj populațional.

30. Să abordăm această problemă prin scrierea codonilor posibili pentru toți aminoacizii (cu excepția Arg și Asp, care nu prezintă nicio modificare) din lanțul citocromului c uman. Apoi, să determinăm numărul minim de substituții nucleotidice necesare pentru fiecare aminoacid modificat în diferite organisme. Odată ce aceste substituții sunt enumerate, numărăm numărul total pentru fiecare organism: cal, 3; porc, 2; câine, 3; pui, 3; broască-bou, 2; ciupercă, 6.

32. (a) Întrucât regiunile genomice necodificatoare sunt probabil silențioase din punct de vedere genetic , este probabil ca acestea să contribuie puțin, dacă nu chiar deloc, la fenotip . Selecția acționează asupra fenotipului; prin urmare, astfel de regiuni necodificatoare sunt probabil neutre din punct de vedere selectiv .

(b) Aceste date privind polimorfismul indică faptul că toate ciclidele din zona Lacului Victoria (lacul și afluenții săi) sunt înrudite printr-un strămoș recent, în timp ce cele din lacurile învecinate sunt înrudite mai îndepărtat. În plus, deoarece Lacul Victoria a secat acum aproximativ 14.000 de ani, este probabil ca acesta să fi fost repopulat de un eșantion relativ mic de ciclide.

34. În general, speciația implică acumularea treptată a modificărilor genetice până când se atinge un punct în care are loc izolarea reproductivă . În funcție de condițiile de mediu sau geografice, modificările genetice pot avea loc rapid sau lent. Acestea pot implica mutații punctuale sau modificări cromozomiale.

36. (a, b, c) Modelul distanțelor genetice în timp indică faptul că, din prezent până în urmă cu aproximativ 25.000 de ani , oamenii moderni și oamenii de Cro-Magnon prezintă un număr aproximativ constant de diferențe. În schimb , o creștere bruscă a distanței genetice poate fi observată atunci când se compară oamenii moderni și oamenii de Cro-Magnon cu neanderthalienii. Rezultatele indică o discontinuitate clară între oamenii moderni , oamenii de Cro-Magnon și neanderthalieni în ceea ce privește variația genetică a ADN-ului mitocondrial eșantionat . Presupunând că tehnicile de eșantionare și analitice utilizate pentru generarea datelor sunt valide, se pare că neanderthalienii au adus o contribuție mică , dacă este cazul, la fondul genetic al oamenilor de Cro-Magnon sau al europenilor moderni . S- ar putea argumenta că absența liniilor de ADN mitocondrial neanderthalieni la oamenii vii este o consecință a derivei aleatorii sau a extincției liniilor de la dispariția neanderthalienilor. Cu toate acestea, examinarea ADN-ului mt la oamenii de Cro - Magnon antici nu arată nicio dovadă a unor relații istorice și sugerează că neanderthalienii nu erau înrudiți genetic cu strămoșii oamenilor moderni .

Capitolul 26

Răspunsuri la secțiunile „Acum rezolvă asta"

26.1 *N,* = 4(NJ^/ *N„* + *N f* = 6,9

26.2 (a) *N,* -25,21

(b) H = 0,5073

(c) F = 0,0776

26.3 (a) 0,396

(b) Pentru a determina *N f* folosim expresia:

N,IN = 0,42

N, = 0,42 x 50 = 21

H, = (1-1/2 *Nt*) ' *H o* = (1-1/42) ^{5} x 0,0198 = 0,01755

H, *IH o* = 0,01755/0,0198 = 0,886

Prin urmare, există o pierdere de aproximativ 11,4% a heterozogoților după cinci generații.

Răspunsuri la probleme și întrebări pentru discuții

2. (a, b) În primul rând, dacă există înregistrări detaliate ale părinților păsărilor captive , atunci ar trebui să fie disponibile informații despre heterozigoți . Ar putea fi stabilite programe de reproducere pentru a restricționa împerecherea între indivizii purtători ai genei letale . Acest tip de „ management al reproducerii " este adesea utilizat în cazul populațiilor captive . Dacă nu sunt disponibile înregistrări ale reproducerii , este adesea posibil să se determine pedigree-urile folosind markeri genetici, cum ar fi polimorfismele microsatelit ADN . Folosind astfel de markeri , perechile reproducătoare pot fi adesea identificate și relația lor cu urmașii lor poate fi stabilită .

Prin combinarea cunoștințelor despre perechile reproducătoare cu probabilitatea producerii unei combinații genetice dăunătoare , se pot realiza împerecheri selective pentru a minimiza influența unei alele dăunătoare. În plus, acești

markeri pot fi utilizați pentru a stabili împerecheri care optimizează amestecul genetic, reducând astfel depresia consangvină.

4. Atât deriva genetică, cât și consangvinitatea tind să conducă populațiile spre homozigoție. Deriva genetică este mai frecventă atunci când dimensiunea efectivă de împerechere a populației este mică. Când această situație predomină, consangvinitatea este, de asemenea, mai probabilă. Acestea diferă prin faptul că consangvinitatea poate apărea atunci când anumite structuri sau comportamente ale populației favorizează împerecherea între rude, indiferent de dimensiunea efectivă a populației.

6. Depresia consangvină, în timp, reduce frecvența heterozigoției, care este în mod normal o trăsătură selectivă avantajoasă a speciei. Atunci când homozigoția crește (din cauza pierderii heterozigoției), alelele dăunătoare sunt susceptibile de a impune o povară genetică mai mare asupra populației. Depresia non-consangvină apare atunci când există o reducere a adaptării biologice a urmașilor indivizilor diverși genetic. Aceasta este de obicei atribuită faptului că urmașii sunt mai puțin adaptați la condițiile locale de mediu decât părinții lor.

   Chiar și atunci când poate fi necesar să se forțeze reproducerea non-endogamă pentru a salva o specie amenințată, atunci când dimensiunea populației este mică, structura genetică a speciei se schimbă semnificativ și permanent.

8. Testele moleculare pentru heterozigoție generală pot indica adesea gradul de consangvinitate și/sau derivă genetică. Atunci când este prezentă consangvinitatea, sau în acest caz derivă genetică, gradul de heterozigoție scade. O alelă a cărei frecvență este dictată de consangvinitate nu va fi afectată izolat. Adică, și alte alele vor fi afectate de scăderea heterozigoției. Prin urmare, dacă genomul în ansamblu are un grad ridicat de heterozigoție, gena este probabil influențată de selecție mai degrabă decât de consangvinitate și/sau derivă genetică.

10. În general, speciile amenințate sunt capturate și crescute într -un mediu artificial până când se obține un număr suficient de exemplare pentru a asigura supraviețuirea speciei. Strategiile de gestionare genetică sunt apoi aplicate pentru a încrucișa indivizii, crescând heterozigoția pe cât posibil. În cazul plantelor, băncile de semințe sunt adesea folosite pentru a menține și facilita supraviețuirea pe termen lung.

12. Aloenzimele sunt variante ale unei proteine specifice care sunt adesea detectate prin electroforeză. O astfel de variație poate avea sau nu un impact asupra stării biologice a unui individ . Cu cât variația aloenzimei este mai mare, cu atât indivizii vor fi mai eterogeni din punct de vedere genetic. În general, există un consens asupra faptului că o astfel de diversitate genetică este esențială pentru supraviețuirea pe termen lung. Toți ceilalți factori fiind egali, variația aloenzimei este mai probabil să reflecte variația fiziologică decât variația RFLP, deoarece regiunile RFLP nu sunt neapărat situate în regiunile care codifică proteinele din genom. Analizele RFLP pot detecta cantități foarte mici de variație genetică într-o populație și este foarte puțin probabil să se găsească un organism care să nu fie într-un fel variabil în ceea ce privește RFLP-urile în comparație cu alte organisme (în cadrul și între specii).

Datele *despre Antechinus* oferă informații despre importanța diversității genetice pentru supraviețuirea unei specii. Întrucât astfel de mecanisme (de exemplu, amestecarea spermatozoizilor) sunt la lucru, trebuie să existe o recompensă evolutivă considerabilă. În acest caz, menținerea diversității trebuie să depășească costul (dacă există) al evoluției unui astfel de mecanism.

16. (a) Întrucât câinii de prerie sunt principala sursă de hrană pentru dihorii cu picioare negre, o reducere a populației de câini de prerie ar afecta probabil dihorii. Dacă nu devin disponibile surse alternative de hrană și nu sunt utilizate de dihori, numărul lor ar scădea.

   (b) Faptul că o populație supraviețuiește unui blocaj populațional nu implică faptul că populația se află într-o stare sănătoasă. Blocajele reduc de obicei variabilitatea genetică de care depind supraviețuirea și adaptarea speciei. Un al doilea blocaj, chiar dacă s-ar putea să nu aibă consecințe imediate, ar avea probabil un impact negativ asupra supraviețuirii pe termen lung a speciei. Ar fi de așteptat o reducere suplimentară a diversității genetice.

   (c) Întrucât dispariția unui organism este ireversibilă, am putea considera viitorul dihorilor drept cea mai mare prioritate. Dacă populația de câini de prerie scade foarte lent, populația de dihori ar putea reuși să găsească surse alternative de hrană, deși acest lucru este îndoielnic. Deoarece populația de dihori este cea mai vulnerabilă dintre cele trei (dihori, câini de prerie și bovine), iar dihorii se numără printre mamiferele cele mai periclitate din America, acest caz ar testa eficacitatea legilor concepute pentru a proteja astfel de specii. În unele situații, nu este posibil să se găsească un compromis care să satisfacă toate părțile.

18. Profilurile ADN indică gradul de heterogenitate al secvențelor genetice și, prin urmare, gradul de variație genetică . Deși secvențele de ADN necodificatoare reprezintă majoritatea diversității secvențelor, aceste informații pot fi utile în determinarea fluxului genic, a liniilor genetice și a diversității inter- și intrapopulaționale generale. Întrucât diversitatea *în sine* pare a fi esențială pentru supraviețuirea pe termen lung a speciilor în medii naturale , este de așteptat ca evaluarea acestei diversități folosind orice tip de instrument să constituie o tehnică predictivă utilă.

20. Un recensământ al mărimii și distribuției populației ar fi necesar pentru a stabili nivelurile de exploatare a habitatului și numărul estimat de perechi reproducătoare eficiente. Pe baza acestor informații, s-ar putea furniza o estimare pe termen lung a sustenabilității habitatului, împreună cu probabilitatea ca deriva genetică să afecteze variabilitatea genetică. Estimările perechilor reproducătoare eficiente

ar oferi, de asemenea, o metodă de estimare a depresiei consangvinității. Eșantionarea sezonieră și anuală ar fi utilă pentru a reduce posibilitatea eșantionării într-o perioadă neobișnuită a anului. Determinarea piramidei de vârste a etapelor de dezvoltare ale populației amenințate ar fi importantă. Prezența unui număr mic de pui sau juvenili ar putea indica o capacitate reproductivă în scădere. Determinarea biodiversității generale și a capacității habitatului de a susține specia, precum și a diversității genetice a speciei în cauză, ar fi importantă. Profilurile ADN nuclear, mitocondrial și cloroplastic pot fi utilizate pentru a evalua variația intrapopulațională și interpopulațională, precum și pentru a ajuta la determinarea modelelor de migrație și reproducere.

22. Deși speciile emblematice (adesea mamifere mari) pot beneficia de un sprijin considerabil și de finanțare publică, acestea pot reduce sprijinul pentru speciile care ar putea avea un impact mai mare asupra unei comunități de specii. Producătorii primari (plantele) sunt componente necesare ale unui habitat divers și utilizabil . Dacă se concentrează pe speciile emblematice dintr-o anumită zonă, alte zone pot avea mult de suferit deoarece speciile cheie se pierd. Utilizarea speciilor umbrelă pe o suprafață geografică extinsă, în speranța de a proteja alte specii din acea zonă, este o abordare rezonabilă. Cu toate acestea , dimensiunea unei zone nu este neapărat factorul principal în determinarea succesului speciilor . Diversitatea și productivitatea unui habitat sunt factori primordiali în determinarea succesului speciilor . Întrucât terenurile sunt la mare căutare, pe termen lung poate fi înțelept să se selecteze specii umbrelă în habitate diverse și productive, mai degrabă decât să se ia în considerare dimensiunea terenului . Selectarea grupurilor de specii cu o biodiversitate considerabilă crește probabilitatea protejării unui habitat suficient de bogat pentru a susține multe specii . Astfel de habitate au adesea o valoare economică considerabilă , ceea ce face ca disponibilitatea lor să fie limitată .

Glosar

5-Brdu Vezi Brdu *(5-bromodeoxiuridină).*

5-metilcitozină *(5-metilcitozină)* O bază citozinică metilată care reprezintă o modificare epigenetică ce alterează expresia genelor.

aberație cromozomială *:* orice duplicație, deleție sau rearanjare a conținutului diploid de cromozomi ai unui organism.

fond genetic *Totalul* tuturor alelelor purtate de membrii reproducători ai unei populații.

dezoxiribonucleic (ADN) este o macromoleculă compusă de obicei din polimeri nucleotidici care conțin lanțuri antiparalele în care reziduurile de zahăr sunt dezoxiriboză și care sunt legate prin legături de hidrogen. Este principalul purtător al informației genetice. Acidul ribonucleic (ARN) este un acid nucleic similar ADN -ului, dar caracterizat prin riboza , uracilul pirimidinic și natura monocatenară a lanțului polinucleotidic. Sunt recunoscute mai multe tipuri, cum ar fi ARN-ul ribozomal, ARN-ul mesager , ARN-ul de transfer și o varietate de molecule mici de ARN reglatoare.

adaptare O componentă ereditară a fenotipului care conferă un avantaj în supraviețuire și succes reproductiv. Procesul prin care organismele se adaptează la condiții normale de mediu.

Adenozin monofosfat ciclic (cAMP, *adenozin monofosfat ciclic)* este o moleculă reglatoare importantă, atât la procariote , cât și la eucariote.

ADN Vezi *acid dezoxiribonucleic.*

ADN-A *(A-A)* O formă alternativă de ADN cu spirală dreaptă, în care helixul este înfășurat mai strâns decât ADN-ul B obișnuit, cu 11 perechi de baze pe rotație completă a helixului. În forma A, bazele helixului sunt decalate lateral și înclinate față de axa longitudinală . Nu se știe dacă această formațiune are o semnificație biologică. Vezi *ADN-B.* ADN-B *(B-ADN) Cea* mai comună conformație a ADN-ului găsită în celule și baza modelului helixului Watson-Crick. Există 10 perechi de baze pe rotație completă a helixului său dreaptă , nucleotidele fiind separate de 0,34 nm. Helixul are un diametru de 2,0 nm.

ADN denaturat *:* molecule de ADN care au fost separate în catene simple.

ADN spațiator *:* secvențe de ADN între gene. De obicei, sunt segmente de ADN repetitive.

ADN giraza este o clasă de enzime cunoscute sub numele de topoizomeraze care transformă ADN-ul circular într- o formă superînrăsucită negativ înainte de replicare, transcripție sau recombinare. Enzima acționează în timpul replicării ADN-ului pentru a reduce tensiunea moleculară cauzată de superînrăsucire.

ADN helicază *(ADN helicază)* Enzimă care participă la replicarea ADN-ului, desfășurând dubla spirală în apropierea furcii de replicare.

ADN ligază O enzimă care formează o legătură covalentă între capătul 5' al unui lanț polinucleotidic și capătul 3' al unui alt lanț polinucleotidic . Se mai numește și enzimă de legare a polinucleotidelor .

ADN mitocondrial (ADNmt) *(ADN mitocondrial, ADNmt)* ADN circular dublu catenar autoreplicant, găsit în mitocondrii , care codifică ARN-urile ribozomale mitocondriale , transferă ARN-urile și proteinele utilizate în funcțiile respirației oxidative a organitelor .

ADN polimerază *(ADN polimerază)* Enzimă care catalizează sinteza ADN - ului din dezoxiribonucleotide folosind o moleculă matriță de ADN .

ADN *polimorfic amplificat aleatoriu (RAPD)* Metodă PCR care utilizează primeri aleatori de aproximativ 10 nucleotide pentru a amplifica secvențe de ADN necunoscute .

ADN *satelit* ADN care formează o bandă minoră atunci când ADN-ul genomic este centrifugat într -un gradient de sare de cesiu. În general , acest ADN constă din secvențe scurte repetate de mai multe ori în genom .

ADN *superînrăsucit* Un tip de structură a ADN-ului în care helixul se încolăcește în jurul său. Aceste structuri pot exista în forme stabile numai atunci când capetele ADN-ului nu sunt libere, ca într-o moleculă de ADN circulară sigilată covalent .

ADN *unic :* secvențe de ADN prezente o singură dată într- un genom.

ADN , vectori de clonare Vezi *vectorul.*

ADNc, ADN complementar (ADNc) ADN sintetizat dintr - un șablon ARN de către enzima transcriptază inversă .

ADN *Z O structură* alternativă „în zig-zag" a ADN-ului în care două lanțuri polinucleotidice antiparalele formează o dublă spirală stângă . Este implicată în reglarea expresiei genelor.

izolarea *reproductivă* Absența încrucișărilor între populații, subspecii sau specii. Izolarea reproductivă poate apărea din cauza unor factori extrinseci , cum ar fi comportamentul, sau a barierelor intrinseci , cum ar fi inviabilitatea hibrizilor.

Albinism : O tulburare cauzată de absența producției de melanină în iris , păr și piele . La om, este foarte adesea moștenită ca o trăsătură autosomal recesivă. Alcaptonurie *: O* boală umană autosomal recesivă cauzată de o deficiență a enzimei acid homogentisic oxidază. Urina indivizilor homozigoți devine închisă la culoare la contactul cu aerul din cauza oxidării acidului homogentisic excretat. Cartilajul adulților homozigoți devine negru din cauza depunerii unui pigment derivat din acidul homogentisic . Acești indivizi dezvoltă adesea artrită . Una dintre posibilele forme alternative ale unei gene, care se distinge de alte alele prin efectele sale fenotipice.

Alelă nulă *:* O alelă mutantă care nu produce niciun produs genetic funcțional. De obicei, este moștenită ca o trăsătură recesivă .

alele *multiple* Între -o populație de organisme , prezența a trei sau mai multe alele ale aceleiași gene.

alolactoză Un derivat al lactozei care acționează ca inductor *în operonul* lac .

alopoliploid *(alopoliploid)* Poliploid format prin unirea a două sau mai multe seturi de cromozomi diferiți, cu o duplicare ulterioară a numărului de cromozomi.

alotetraploid *(alotetraploid)* Alopoliploid care conține două genomuri derivate din specii diferite.

alozimă Formă *alelă* a unei proteine care poate fi distinsă de alte forme prin electroforeză.

Secvență A/u *(secvență Alu)* O secvență de ADN dispersată de aproximativ 300 de perechi de baze găsită în genomul primatelor, care este secționată de enzima de restricție *Alu* I. La oameni, între 300.000 și 600.000 de copii sunt dispersate în întregul genom, constituind 3 până la 6% din genom . Vezi *elemente scurte intercalate.*

mediu *:* Ansamblu de factori geografici, climatici și biotici în care trăiesc organismele.

Aminoacid C-terminal (*aminoacid C-terminal)* Într-un lanț peptidic, aminoacidul terminal care are o grupare carboxil liberă .

Aminoacid N-terminal *(aminoacid N-terminal)* Într -un lanț peptidic , aminoacidul terminal care are o grupare amino liberă.

aminoacizi *(aminoacizi)* Acizi aminocarboxilici care cuprind subunitățile legate covalent pentru a forma proteine.

amniocenteză *(amniocenteză)* Procedură utilizată pentru testarea fetală, în care lichidul și celulele fetale sunt extrase din cavitatea amniotică care înconjoară fătul .

Amplificarea genelor *:* Procesul prin care secvențele unei gene sunt selectate pentru replicare extracromozomială sau intracromozomială diferențială.

anabolism *(anabolism)* Sinteză metabolică a moleculelor complexe din precursori mai puțin complecși.

anafază *(anafază)* Etapa mitozei sau meiozei în care cromozomii încep să se deplaseze către polii opuși ai celulei.

Anafaza I Faza primei diviziuni meiotice în care membrii perechilor de cromozomi omologi se separă. **Test** *cis- trans :* Analiză genetică pentru a determina dacă două mutații sunt localizate în cadrul aceluiași cistron (sau genă).

analiza chi-pătrat, *% ^{2} (Analiza chi-pătrat)* Un test statistic pentru a determina dacă un set de date observate se potrivește cu datele așteptate teoretic.

Analiza tetradelor *:* O metodă care analizează linkage-ul și recombinarea la organismele care au o fază haploidă predominantă în ciclul lor de viață. Vezi și *tetradă.*

Analiza structurii fine genetice *(analiza structurii fine genetice)* Analiză recombinațională intragenică care oferă informații de cartografiere intragenică la nivelul nucleotidelor individuale.

Analog *(analog)* Un compus chimic care diferă structural de un compus similar, dar al cărui comportament chimic este același. Este utilizat experimental pentru a asigura o detectare îmbunătățită în timpul analizei. Vezi și *analog de bază* .

analog de bază *:* O bază purinică sau pirimidinică care diferă structural de cele utilizate în mod normal în sistemele biologice, dar al cărei comportament chimic este același. Utilizată experimental pentru a asigura o detectare îmbunătățită în timpul analizei; de exemplu, 5-bromouracilul, care „arată ca" timidina, o înlocuiește și poate fi detectat datorită masei sale mai mari . Vezi și *analog.*

Anemia *falciformă* este o boală genetică umană cauzată de o genă autozomal recesivă, de obicei fatală la homozigoți dacă nu este tratată corespunzător . Este cauzată de o substituție nucleotidică care modifică un aminoacid din lanțul *globinei* .

Aneuploidie *:* O afecțiune în care numărul de cromozomi nu este un multiplu exact al numărului haploid. **Amfidiploid** *:* La fel ca alotetraploid. **Adnotare** *:* Analiza datelor secvenței de nucleotide genomice pentru a identifica genele care codifică proteine, **genele care nu codifică proteine** și secvențele și funcțiile de reglare ale fiecărei gene.

Anticipare . Vezi *anticipare genetică.* **Anticiparea** *genetică* este un fenomen în care severitatea simptomelor tulburărilor genetice crește semnificativ de la o generație la alta. Este cauzată de expansiunea repetițiilor de trinucleotide în sau în apropierea unei gene . A fost observată pentru prima dată în distrofia miotonică.

anticodon *(anticodon)* Într-o moleculă de ARNt, un triplet de nucleotide care se leagă de tripletul de codoni complementari al unei molecule de ARNm.

Anticorp *:* O proteină (imunoglobulină) produsă ca răspuns la un stimul antigenic, care are capacitatea de a se lega specific de un antigen.

antigen *(antigen)* Moleculă, de obicei o proteină de pe suprafața celulară, care poate induce formarea de anticorpi, **antigene de histocompatibilitate** *(antigene de histocompatibilitate) Vezi HLA.*

Antiparalel *:* Un termen care descrie molecule aliniate paralel una cu cealaltă, dar care se desfășoară în direcții opuse. Este în general folosit pentru a descrie orientarea opusă a celor două catene ale unei molecule de ADN.

împerechere **aleatorie** Încrucișare a indivizilor fără a ține cont de genotip.

Împerechere selectivă *(împerechere asociativă):* Împerechere nealeatorie între masculi și femele ale unei specii. Selecția este pozitivă dacă perechile care se împerechează au același genotip; selecția este negativă dacă perechile care se împerechează au genotipuri diferite.

apoptoză *(* program de moarte celulară controlat genetic, activat ca parte a dezvoltării normale sau ca o consecință a deteriorării celulare.

ARN Vezi *acid ribonucleic.*

ARN antisens *(ARN antisens)* O moleculă de ARN (nesintetizată *in vivo* sau *in vitro)* a cărei secvență de ribonucleotide este complementară unei părți a unei molecule de ARNm.

Interferență ARN (ARNi) *(interferență ARN, ARNi)* Inhibarea expresiei genelor în care un complex proteic (complex de silențiere indus de ARN sau RISC), care conține o catenă de ARN parțial complementară, se leagă de un ARNm, determinând degradarea ARNm-ului sau reducerea nivelului său de translație.

ARN de transfer (ARNt) *(ARN de transfer, ARNt)* Moleculă mică de acid ribonucleic care are un rol esențial în *translație.* ARNt-urile conțin: (1) un segment cu trei baze (anticodon) care recunoaște un codon pe ARNm; (2) un situs de legare pentru un aminoacid specific corespunzător anticodonului ; și (3) situsuri de recunoaștere pentru interacțiunea cu ribozomii și cu enzima care unește ARNt-ul la aminoacidul său specific.

ARN mesager (ARNm) *(ARN mesager, ARNni)* moleculă de ARN transcrisă din ADN și tradusă în secvența de aminoacizi a unui polipeptid.

ARN nuclear eterogen (ARNh) *(ARN nuclear eterogen, ARNhn)* Colecție de transcrieri de ARN din nucleu, reprezentând precursorii și intermediarii procesării ARNr, ARNm și ARNt. De asemenea, reprezintă transcrieri de ARN care nu vor fi transportate în citoplasmă, cum ar fi ARNn-urile mici.

ARN-ul nuclear mic *(snARN)* este un tip abundent de moleculă mică de ARN, cu dimensiuni cuprinse între 90 și 400 de nucleotide, care, în asociere cu -proteinele, formează ribonucleoproteine cunoscute sub numele de snRNP sau *snurps.* Situate în nucleoplasmă, snARN-urile sunt implicate în procesarea pre-ARNm și pot avea o varietate de funcții de splicing și îmbinare.

ARN polimerază Enzimă care catalizează formarea unui lanț polinucleotidic de ARN utilizând secvența de baze a unei molecule de ADN ca matriță.

ARN ribozomal (ARNr) *(ARN ribozomal, ARNr)* molecule de ARN care sunt componente structurale ale subunităților ribozomale. La procariote , există molecule 16S, 23S și 5S; la eucariote, există molecule 18S, 28S și 5S. Vezi și *coeficientul Svedberg (S).*

care conține repetiții telomerice (TERRA) Molecule mari de ARN necodificatoare transcrise din repetiții telomerice care fac parte integrantă a heterocromatinei telomerice.

ARNhn *(ARNhn)* Vezi *ARN nuclear eterogen.*

ARNm *(ARNm)* Vezi *ARN mesager.*

ARNm policistronic *(ARNni policistronic)* Moleculă de ARN mesager care codifică secvența de aminoacizi a două sau mai multe lanțuri polipeptidice ale genelor structurale adiacente.

ARNr *(ARNr)* Vezi *ARN ribozomal.*

ARNt *(ARNt)* Vezi *ARN de transfer.*

ARNt aminoacil *(ARNt aminoacil) O* combinație legată covalent de un aminoacid și o moleculă de ARNt. Numit și ARNt încărcat.

ascus *(ascu)* La ciuperci, sacul care înconjoară cei patru sau opt ascospori.

ascospor *:* Un spor meiotic produs în anumite ciuperci. Consiliere genetică *:* Analiza riscului de defecte genetice într -o familie și prezentarea opțiunilor disponibile pentru a evita sau reduce riscurile potențiale.

Atenuator *:* Secvență nucleotidică situată între promotor și gena structurală a unor operoni bacterieni care reglează tranzitul ARN polimerazei, reducând -transcripția genei structurale înrudite.

ATP Adenozin trifosfat, un nucleotid care este principala sursă de energie pentru celule.

Autofecundare *(autofecundare) În genetica plantelor, fecundarea* ovulelor unei plante cu polenul produs de aceeași plantă. Reproducere prin autofecundare.

autogamie *(autogamie)* Proces de autofecundare care dă naștere -homozigoției.

autopoliploid *(autopoliploidie)* Poliploid care rezultă din duplicarea unui set diploid de cromozomi.

Autoradiografie *(autoradiografie)* Producerea unei imagini fotografice prin dezintegrare radioactivă. Se utilizează pentru localizarea compușilor marcați radioactiv în celule și țesuturi sau pentru identificarea sondelor radioactive în diverse tehnici de hibridizare . Vezi hibridizare Southern.

Autozomii sunt cromozomi , alții decât cromozomii sexuali. La oameni , există 22 de perechi de autozomi .

autotetraploid *(autotetraploid)* Autopoliploid compus din patru copii ale aceluiași genom.

auxotrof *(auxotrof)* Linie celulară sau microorganism mutant care are nevoie de o substanță nutritivă pentru a crește, de care tulpinile de tip sălbatic nu au nevoie deoarece o pot sintetiza ; bacterie lizogenă *(bacterie lizogenă)* Celulă bacteriană care poartă ADN -ul unui bacteriofag atenuat integrat în cromozomul său .

bacteriofag *(bacteriofag)* Virus care infectează bacteriile, folosindu -le ca gazdă pentru reproducerea sa (numit și fag), mu *(p)* bacteriofag (bacteriofag mu) Grup de fagi în care materialul genetic se comportă ca o secvență de inserție (adică, capabil de inserție, excizie, transpoziție, inactivare a genelor gazdă și inducere de rearanjări cromozomiale).

Bandare cromozomială *:* O tehnică de colorare diferențială a cromozomilor mitotici sau meiotici, rezultând un model de bandare caracteristic; sau colorarea selectivă a anumitor regiuni cromozomiale, cum ar fi centromerii, regiunile organizatorului nucleolar și regiunile bogate în GC sau AT. Nu trebuie confundată cu modelul de bandare al cromozomilor politenici, care este produs prin alinierea cromomerilor. Corp Barr *:* O masă de ADN care se colorează intens, observată în nucleii somatici ai mamiferelor femele. Descoperit de Murray Barr, acest corp este un cromozom X inactivat.

/3-galactozidază *(ji-galactozidază)* Enzimă bacteriană codificată de gena *lacZ* care transformă lactoza în galactoză și glucoză .

Biodiversitate *:* Diversitatea genetică prezentă în populațiile și speciile de animale și plante.

Biologie sistemică *:* Un domeniu care identifică și analizează rețelele de gene și proteine, pentru a înțelege

reglarea intracelulară a metabolismului, comunicarea intra- și intercelulară și interacțiunile complexe din interiorul și dintre celule.

Biologie sintetică *:* Un domeniu de cercetare care combină știința și ingineria pentru a încerca să înțeleagă complexitatea sistemelor biologice și să construiască sisteme bazate pe biologie care nu există în natură.

biometrie Aplicarea statisticii și a metodelor statistice la probleme biologice.

Bioinformatică *:* Un domeniu care se concentrează pe **proiectarea** și utilizarea de software și metode informatice pentru stocarea, analiza și gestionarea informațiilor biologice, cum ar fi secvențele de nucleotide sau secvențele de aminoacizi.

Biotehnologie *(biotehnologie)* Procese comerciale și/sau industriale care utilizează organisme sau produse biologice.

bivalenți (*bivalenți)* Cromozomi omologi în sinapsă în prima profază a meiozei.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - Instrument de căutare pentru aliniere locală de bază) este o familie de motoare de căutare concepute pentru a compara sau interoga secvențe de nucleotide sau aminoacizi în raport cu secvențele stocate în baze de date. BLAST calculează, de asemenea, semnificația statistică a potrivirilor găsite.

Fenotipul Bombay *:* o variantă rară a sistemului antigenic ABO în care indivizii afectați nu au nici antigeni **A**, nici B și, prin urmare, par a fi de grupa sanguină O, chiar dacă genotipul lor poate purta alele neexprimate ale antigenelor A și/sau **B**.

BrdU *(5-brontodeoxiuridină) Un* analog de timidină activ mutagen în care **un atom** de brom înlocuiește gruparea metil **din** poziția 5' a timinei; abreviat și BUdR. **C, valoare** Cantitate haploidă de ADN prezentă într-un genom, **catena** *conducătoare* În timpul replicării ADN-ului, catena se sintetizează continuu în direcția furcii de replicare.

Catena întârziată *:* În timpul replicării ADN-ului, catena care este sintetizată discontinuu, în direcția opusă față de furca de replicare. Vezi și *fragmentul Okazaki* .

Caseta CAAT *:* O secvență de ADN extrem de conservată , găsită în regiunea promotorului netradusă a genelor eucariote. Această secvență este recunoscută de factorii de transcripție.

Cutie *GC* **La** eucariote, o regiune a unui promotor care conține o secvență 5'-GGGCGG-3', care este **un** situs de legare pentru proteinele reglatoare transcripționale.

Cutia Goldberg-Hogness *:* O secvență scurtă de nucleotide situată la 20-30 de perechi de baze în amonte **de** situsul de inițiere al genelor eucariote de care se leagă ARN polimeraza II. Secvența consens este TATAAAA. Este cunoscută și sub numele de cutia TATA.

homeobox *O* secvență de aproximativ 180 de nucleotide care codifică o secvență de 60 de aminoacizi numită *domeniul homeotic* , care face parte dintr-o proteină de legare a ADN-ului ce acționează ca factor de transcripție.

Caseta Pribnow *:* În genele procariote, o secvență de șase perechi de baze de care se leagă subunitatea sigma (O) a ARN polimerazei , în amonte de începutul transcripției . Secvența consens pentru *această* casetă *este* TATAAT. Caseta **TATA** Vezi *caseta Goldberg-Hogness.*

cheală *:* O zonă limpede pe un gazon bacterian tern, cauzată de creșterea și reproducerea **unui** singur bacteriofag.

CAP *(proteină activatoare de catabolit)* Proteină activatoare de catabolit ; o proteină care se leagă de AMPc și reglează activarea operonilor inductibili.

caracter *(* sau *trăsătură)* Atribut fenotipic observabil al **unui** organism.

trăsătură **complexă** O trăsătură al cărei fenotip este determinat de interacțiunea mai multor gene și factori de mediu .

Trăsătură familială *:* O trăsătură transmisă și exprimată prin membrii unei familii. Este de obicei folosită pentru a descrie o **trăsătură** care afectează **familiile** , dar al cărei mod precis de moștenire este neclar .

cancerigen Agent fizic **sau** chimic **care** provoacă cancer .

Încărcătură genetică *:* Numărul mediu **de** gene letale recesive purtate **în** heterozigoție de către **un** individ dintr-o populație.

cariokineză Procesul de diviziune nucleară , **cariotipul** Complementul cromozomial al unei celule sau al unui individ. Este adesea folosit pentru a se referi la aranjamentul cromozomilor în metafază într -o secvență în funcție de lungimea **lor** și de poziția centromerului.

cariotip *spectral* Vizualizarea **tuturor** cromozomilor unui **organism** sub forma unui cariotip, fiecare cromozom fiind pictat cu o culoare diferită .

catabolism *(catabolism) O* reacție metabolică în care moleculele complexe sunt descompuse **în** forme mai simple, adesea însoțită de eliberarea de energie.

mutație ***ede*** *O* clasă de mutații ale ciclului de diviziune celulară la ***drojdie*** care afectează momentul și **progresia** prin ciclul celular.

primer - în acizi nucleici , un fragment scurt de ARN sau ADN monocatenar necesar pentru inițierea sintezei dirijate *de polimerază* .

Celulă F Celulă bacteriană care nu are factorul de fertilitate și acționează ca receptor în conjugarea bacteriană .

celula F (F $^{+}$ *celulă)* Celulă bacteriană care are factorul de fertilitate și acționează ca donator **în** conjugarea bacteriană *, celule stem* **canceroase** Celule care formează tumori în cancer, putând da naștere la toate tipurile de celule ale **unei anumite** forme de cancer. Aceste celule au proprietățile celulelor stem normale : autoreînnoire și capacitatea de a se diferenția în mai multe tipuri de celule, celule **stem embrionare** . Celule obținute din masa celulară internă a embrionilor de blastocist timpuriu la mamifere. Aceste celule sunt pluripotente, adică se pot diferenția în oricare dintre tipurile de celule embrionare sau adulte caracteristice organismului.

celule *somatice* Toate celulele unui organism , altele **decât** celulele germinale sau gameții.

CEN Regiunea centromerului ADN-ului, esențială pentru funcția sa . La drojdie, fragmente de ADN cromozomial, cu o lungime de aproximativ 120 de perechi de baze, care, atunci când sunt inserate în plasmide, le conferă capacitatea de a se separa în timpul mitozei. Centimorgan (cM) Unitate de măsură a distanței dintre genele de pe cromozomi , care reprezintă 1% din încrucișarea dintre două gene. Este echivalentă cu 1 unitate de măsură (um).

Centrifugarea în gradient *de densitate este* o metodă de separare a amestecurilor de macromolecule care utilizează forțe centrifuge și solvenți cu densitate variabilă. În centrifugarea în gradient de densitate de echilibru folosind clorură de cesiu, soluția de cesiu stabilește un gradient sub influența câmpului centrifugal, iar un amestec de macromolecule, cum ar fi ADN-ul , sedimentează în gradient până când densitatea solventului este egală cu cea a macromoleculei, separându-le prin diferențe de densitate. Uneori se numește centrifugare de echilibru prin sedimentare.

Centriol *:* O organită citoplasmatică compusă din nouă grupuri de microtubuli, în general aranjați în tripleți. Centriolii funcționează prin generarea de cili și flageli și servesc ca puncte focale pentru fibrele fusului de diviziune în timpul diviziunii celulare.

Centromer *:* O regiune cromozomială heterocromatică specializată unde cromatidele surori rămân atașate după replicare și unde fibrele fusului de diviziune se atașează în timpul diviziunii celulare. Locația centromerului determină forma cromozomului în timpul anafazei diviziunii celulare. Este cunoscută și sub numele de constricție primară.

centrosom *(centrosom)* Regiunea citoplasmei care conține o pereche de centrioli.

tulpină *:* Un grup de organisme cu strămoși comuni care au caracteristici fiziologice sau morfologice de interes pentru studiul genetic sau domesticirea.

Proteina CFTR *(regulatorul conductanței transmembranare a fibrozei chistice)* este codificată de *gena CFTR.* Această proteină reglează mișcarea ionilor de clorură prin membrana plasmatică a celulelor epiteliale. Mutațiile din *CFTR* duc la fibroză chistică.

chaperonă *(chaperonă)* Proteină care reglează plierea unui polipeptid într-o formă tridimensională funcțională.

Cip ADN *(micromatrice ADN):* Un aranjament ordonat de secvențe de ADN sau oligonucleotide pe un substrat (adesea sticlă). Cipurile ADN sunt utilizate în teste cantitative de legare ADN-ADN sau ADN-ARN, pentru a măsura profilurile de expresie genică (de exemplu, în timpul dezvoltării sau pentru a compara diferențele de expresie genică dintre celulele normale și celulele canceroase).

Cip genetic . Vezi *cip ADN.*

ChIP-on-chip este o tehnică ce combină imunoprecipitarea cromatinei (ChIP) cu cipuri ADN pentru a identifica și localiza situsurile ADN de care se leagă proteinele de interes care leagă ADN-ul. Aceste situsuri pot fi amplificatori, promotori, situsuri de start al transcripției sau alte regiuni funcționale ale ADN-ului.

Șoc termic *:* Un răspuns genetic tranzitoriu care urmează expunerii celulelor sau organismelor la temperaturi ridicate . Răspunsul include activarea unui număr mic de loci, inactivarea unor loci anterior activi și traducerea selectivă a ARNm-ului de șoc termic.

Cicline *(cicline)* În celulele eucariote, un tip de proteină care este sintetizată și degradată sincron cu ciclul celular și reglează trecerea prin fazele ciclului .

Ciclu celular *:* Secvența fazelor de creștere ale unei celule individuale; este împărțită în G1 (interval 1), S (sinteza ADN-ului), G2 (interval 2) și M (mitoză). O celulă poate ieși temporar sau permanent din ciclul celular, caz în care se spune că intră în starea G0.

Ciclu de declin rapid *:* O perioadă de creștere rapidă a populației, urmată de o reducere drastică a dimensiunii populației.

știință *criminalistică* Utilizarea metodelor științifice de laborator pentru obținerea de date utilizate în cauze penale și civile.

Zigoten *:* Etapa profazei I a meiozei în care cromozomii omologi fac sinapse și se împerechează pe întreaga lor lungime, formând bivalenți. Complexul sinaptineal se formează în această etapă.

zigot *(zigot)* Celulă diploidă produsă prin fuziunea nucleilor gameților haploizi.

Kinetocor *:* O structură fibroasă cu dimensiunea de aproximativ 400 nm, situată în centromer. Este locul unde se atașează microtubulii în timpul diviziunii celulare .

cistron *(cistron)* Porțiune a unei molecule de ADN, adesea referindu-se la o genă, care codifică un singur lanț polipeptidic; definită prin analiza genetică ca o regiune în care două mutații nu se pot completa reciproc.

citokineză *(citokineză)* Diviziunea sau separarea citoplasmei în timpul mitozei sau meiozei.

citoschelet *(citoschelet)* Rețea internă de microtubuli, microfilamente și filamente intermediare care dau formă și capacitate de mișcare unei celule eucariote.

Citogenetică *(citogenetică)* Ramură a biologiei în care tehnicile citologice și genetice sunt utilizate în cercetarea genetică, sortarea celulelor fetale *(sortarea celulelor fetale) Metodă* neinvazivă de diagnostic prenatal care preia și analizează celulele fetale din circulația maternă.

clină *(dină)* Gradient de genotipuri sau fenotipuri distribuite de-a lungul unei regiuni geografice.

clonă *(clonă)* Molecule, celule sau organisme identice genetic, derivate de la un singur strămoș prin metode asexuate sau parasexuale, cum ar fi un segment de ADN care a fost inserat într -o plasmidă sau în cromozomul unui fag sau al unei bacterii și replicat pentru a forma mai multe copii sau un organism cu o structura genetică identică cu cea utilizată în producerea sa.

Clonare prin metoda „shotgun” *: Clonarea* unor fragmente aleatorii de ADN genomic într-un vector (o plasmidă sau un fag), de obicei pentru a crea o bibliotecă de gene din care pot fi selectate clone de interes specific, de exemplu, pentru secvențiere. Clonare pozițională *:* Identificarea și clonarea ulterioară a unei gene fără a cunoaște produsul său polipeptidic sau funcția sa. Procesul utilizează cosegregarea fenotipurilor mutante cu markeri ADN pentru a identifica

cromozomul care conține gena; poziția genei este identificată prin stabilirea legăturii cu markeri suplimentari. Cloroplast *:* O organită citoplasmatică autoreplicantă care conține clorofilă. Este locul fotosintezei. Cod degenerat *:* Reprezentarea unui anumit aminoacid folosind mai mult de un codon.

Cod genetic *:* Triplete de deoxinucleotide care codifică cei 20 de aminoacizi sau specifică terminarea traducerii.

Cod histonic *:* Diverse modificări chimice aplicate cozilor histonice (capetele libere ale moleculelor de histonă care ies din acizii nucleici). Aceste modificări influențează interacțiunile ADN-histonă și promovează sau reprimă transcripția.

Cod suprapus *:* Un cod genetic propus în care orice triplet dat este partajat de mai mult de un codon adiacent.

Cod universal *:* Codul genetic utilizat de toate formele de viață. Mitocondriile, ciliate și micoplasmele au unele excepții.

CODIS (Sistem combinat de indexare a ADN-ului *)* Set standardizat de 13 repetiții scurte în tandem (STR) ale secvențelor de ADN utilizate de agențiile guvernamentale și de organele de aplicare a legii pentru a pregăti profiluri ADN.

Codominanță *:* O situație în care efectele fenotipice ale alelelor unei gene sunt exprimate complet și simultan la heterozigot .

Codon *(codon)* Un triplet de nucleotide care specifică un anumit aminoacid sau un semnal de început sau de oprire în codul genetic. Șaizeci și unu de codoni specifică aminoacizii prezenți în proteine, iar trei codoni, numiți codoni stop, semnalează terminarea creșterii lanțului polipeptidic. Un codon acționează ca un codon de început pentru a identifica un aminoacid.

Codonul chihlimbar *(* codonul UAG), care nu codifică un aminoacid, ci mai degrabă terminarea lanțului. Unul dintre codonii stop.

codon de inițiere *(codon de inițiere)* triplet nucleotidic (AUG) care într -o moleculă de ARNm codifică inserția aminoacidului metionină ca prim aminoacid al unui lanț polipeptidic.

codon fără sens *:* un triplet de nucleotide (UGA, UAG și UAA) dintr-o moleculă de ARNm care marchează terminarea translației.

coeficient de coincidență *:* Proporția dintre numărul observat de recombinante duble împărțită la numărul așteptat de astfel de încrucișări.

Coeficientul de consangvinitate *:* Probabilitatea ca două alele prezente într-un zigot să fie descendente ale unui strămoș comun.

Coeficient de migrație *:* o măsură a proporției de gene migrante introduse în populație per generație.

coeficient de sedimentare (S) Vezi *unitatea de măsură a coeficientului Sverdberg.*

coeficient de selecție ($) *(coeficient de selecție)* Măsură a dezavantajului reproductiv al unui anumit genotip într-o populație.

doar 99 din 100 de indivizi cu genotipul *aa supraviețuiesc, atunci* coeficientul de selecție este 0,01. Măsură cantitativă a adaptării biologice relative a unui genotip în comparație cu altul.

Cohesină *(coezina)* Complex proteic care găzduiește cromatidele surori în timpul mitozei și meiozei și facilitează atașarea fibrelor fusului de celule la kinetocori.

Colchicina *este* un compus alcaloid care inhibă formarea fusului de diviziune celulară în timpul diviziunii celulare. Se utilizează în prepararea cariotipului pentru a colecta populații mari de celule inhibate în metafaza mitozei.

Coliniaritate *:* Relație liniară dintre secvența de nucleotide a unei gene (sau a ARN-ului transcris din aceasta) și ordinea aminoacizilor din lanțul polipeptidic specificat de genă.

Coloranții acridinici sunt un tip de compus organic care se leagă de ADN și se intercalează în structura sa bicatenară , producând întreruperi locale în împerecherea bazelor. Aceste întreruperi duc la adăugiri sau deleții în următoarea rundă de replicare.

Compensarea dozei *:* Un mecanism genetic care reglează nivelurile de expresie ale genelor la loci de pe cromozomul X. La mamifere, acest lucru se realizează prin inactivarea aleatorie a unuia dintre cromozomii X, ducând la formarea corpilor Barr.

competiție La bacterii, o stare tranzitorie în care celula se poate lega și încorpora molecule de ADN exogene, permițând transformarea. Complementaritatea *este* afinitatea chimică dintre bazele azotate ale lanțurilor de acid nucleic, ca o consecință a legăturilor de hidrogen. Este responsabilă de împerecherea bazelor dintre lanțurile dublei helixuri de ADN și lanțurile de ARN în timpul exprimării genelor în celule și în timpul utilizării tehnicilor de hibridizare moleculară.

complexitate (X *)* Numărul total de nucleotide sau perechi de nucleotide dintr-o populație de molecule de acid nucleic, determinat prin cinetica de reasociere,

complex sinaptonemal (CS) *O* structură submicroscopică compusă dintr-o panglică tripartită de ribonucleoproteine care se formează între cromozomii omologi perechi în stadiul de pahitenă în prima diviziune meiotică .

concatemer *:* Un lanț liniar sau o serie de subunități unite. Procesul de formare a concatemerului se numește concatenare (de exemplu, mai multe unități ale unui genom fagic produse în timpul replicării). concordanță *:* Perechi sau grupuri de indivizi cu fenotipuri identice. În studiile pe gemeni, o situație în care ambii gemeni fie posedă, fie nu posedă trăsătura investigată. configurație *cis :* Aranjamentul a două gene (sau două situsuri mutante pe o genă) pe același omolog, cum ar fi

un [1] *un* [2]

~+ +"

Aceasta contrastează cu configurația trans , în care alelele mutante sunt situate pe omologi opuși.

configurație trans *:* Un aranjament în care două alele mutante sunt situate pe omologi opuși, cum ar fi ri1 +

+ la 2

ceea ce contrastează cu cis-ordonarea *,* în care cele două alele sunt situate pe același omolog.

Conformație de cuplare . Vezi *configurația cis* .

conjugare *Unire temporară* a două organisme celulare pentru transferul sexual de material genetic, *consangvină*. Înrudite printr-un strămoș comun de câteva generații înainte.

contigo *(contig)* Secvență continuă de ADN reconstruită din secvențe de ADN suprapuse obținute prin clonare sau analiză de secvențe.

conversie genică *:* Un proces de recombinare nereciprocă prin care o alelă a unui individ heterozigot este convertită în alela corespunzătoare.

Corectură *:* Mecanism molecular pentru detectarea și corectarea erorilor de replicare, transcripție sau traducere.

Splicing alternativ *:* Generarea de molecule proteice diferite din același pre-ARNm, prin încorporarea unui set diferit de exoni și într-o ordine diferită în ARNm-ul produs.

Cosmid *:* Un vector conceput pentru a permite clonarea unor segmente lungi de ADN străin. Cosmidele sunt hibrizi formați prin situsuri *cos* ale fagului x inserate într-o plasmidă . În timpul clonării, moleculele de ADN recombinant sunt ambalate în învelișul proteic al fagului , iar după infectarea celulelor bacteriene, molecula recombinantă se replică și poate fi menținută ca plasmidă.

Insulă CpG *:* O regiune scurtă de ADN reglator situată în amonte de gene și care conține extensii nemetilate de secvențe cu o frecvență mare de nucleotide C și G.

Fermoar leucină : În proteinele care leagă ADN-ul , un motiv structural caracterizat printr-un segment de reziduuri de leucină separate prin șapte reziduuri de aminoacizi, cu regiuni adiacente de aminoacizi încărcați pozitiv. Fermoarele leucină a două polipeptide pot interacționa pentru a forma un dimer care se leagă de ADN.

Boala Creutzfeldt - *Jakob (BCJ)* este o boală degenerativă progresivă și fatală a creierului și a sistemului nervos, cauzată de mutații care duc la forme aberante ale proteinei codificate (prioni). Este moștenită ca o trăsătură autosomal dominantă.

Cristalografie cu raze *X :* O tehnică de determinare a structurii tridimensionale a moleculelor prin analizarea modelelor de difracție cu raze X produse de împrăștierea razelor X de către cristalele moleculei analizate. Cromatidă *:* Una dintre unitățile longitudinale ale unui cromozom replicat.

Cromatină *:* Complexul de ADN, ARN, proteine histonice și non-histone care constituie cromozomii necrozomi , caracteristici nucleului interfazic al eucariotelor . Cromatografie *:* O tehnică de separare a unui amestec de molecule solubilizate prin migrarea lor diferențială pe un substrat.

cromocentru În cromozomii politenici, un agregat de centromeri și elemente heterocromatice unde cromozomii par a fi uniți.

Cromomer *:* O regiune spiralată, de formă sferică, de pe un cromozom, cel mai ușor vizibilă în timpul diviziunii celulare. Alinierea cromomerilor în cromozomii politeni este responsabilă pentru modelul lor caracteristic de benzi.

cromozom La procariote, o moleculă de ADN care conține genomul organismului; la eucariote, o moleculă de ADN care formează un complex cu ARN *și* proteine pentru a forma o structură alungită ce conține informații genetice aranjate într-o secvență liniară; o structură vizibilă în timpul mitozei și meiozei.

cromozom *acentric* Cromosom sau fragment de cromozom fără centromer.

Cromozom acrocentric *:* Un cromozom cu centromerul situat foarte aproape de un capăt. Cromozomii umani 12, 14, 15, 21 și 22 sunt acrocentrici. Cromozom dicentric *:* Un cromozom care are doi centromeri, care pot fi trași în direcții opuse în timpul anafazei diviziunii celulare .

Cromozomii Lampbrush *sunt* cromozomi meiotici caracterizați prin bucle laterale extinse, care ating extensia maximă la nivelul diplotenei. Deși au fost studiate cel mai intens la amfibieni, aceste structuri se găsesc în celulele meiotice ale unor organisme, de la insecte la oameni.

cromozom *echilibrator* Un cromozom care conține una sau mai multe inversiuni care suprimă încrucișarea cu omologul său și poartă un marker dominant care este de obicei letal în cazul homozigozității.

Cromozomul *Philadelphia* este produsul unei translocații reciproce la om care conține brațul scurt al cromozomului 9, care poartă *oncogena C-ABL,* și brațul lung al cromozomului 22, care poartă *gena BCR.*

Cromozomi omologi *:* Cromozomi care formează perechi sau fac sinapse în timpul meiozei și sunt identici în ceea ce privește loci-urile genetice și poziția centromerului.

cromozom *metacentric este* un cromozom cu un centromer echidistant de capete, rezultând brațe cromozomiale de aceeași lungime. Un cromozom politen , literalmente un cromozom cu multe catene, este un cromozom care a trecut prin mai multe cicluri de replicare a ADN-ului fără ca catenele replicate să se separe, rămânând exact paralele. Rezultatul este un cromozom gigantic cu cromomeri aliniați, producând un model caracteristic de benzi, adesea studiat în celulele glandelor salivare larvare ale *speciei Drosophila.*

cromozom *sexual* Cromozom implicat în determinarea sexului, cum ar fi cromozomii X sau Y la specia umană.

cromozom submetacentric *:* Un cromozom cu centromerul poziționat astfel încât un braț al cromozomului este puțin mai lung decât celălalt. cromozom telocentric *:* Un cromozom în care centromerul este situat la capătul cromozomului.

Cromozomul X *(cromozomul X)* Cromozom sexual întâlnit la speciile la care femelele au sexul homogametic (XX).

Cromozomul Y (*cromozomul Y)* Cromozom sexual la speciile în care masculul este de sex heterogametic (XY).

Cromozomii W, Z (*cromozomii* W, Z) Cromozomi sexuali găsiți la speciile la care femela are sexul heterogametic (WZ).

cromozomi *X atașați :* Unirea a doi cromozomi X care au un singur centromer și migrează împreună în timpul diviziunii celulare.

testcross Încrucișare *între* un individ al cărui genotip la unul sau mai multe loci este necunoscut și un individ care este homozigot recesiv pentru gena sau genele în cauză.

încrucișare dihibridă Încrucișare genetică care implică două trăsături ai căror părinți posedă forme diferite ale fiecăreia (de exemplu, mazăre galbenă, rotundă X mazăre verde, ridată).

încrucișare monohibridă *:* o încrucișare genetică care implică o singură trăsătură (de exemplu, *AA* x *aa)*

încrucișare *reciprocă* O pereche de încrucișări în care genotipul femelei din prima încrucișare se regăsește ca genotip al masculului din a doua încrucișare și invers.

retroîncrucișare Încrucișare între un heterozigot al genei Fj și unul dintre părinții P (sau cu un organism identic cu unul dintre părinți).

Blocaj populațional *:* O reducere drastică a dimensiunii populației, cu pierderea consecventă a diversității genetice, urmată de o creștere a dimensiunii populației. Populația reconstituită are un fond genetic cu o diversitate mai mică din cauza derivei genetice.

corp *polar* Produs la femele în prima sau a doua diviziune meiotică a gametogenezei, o celulă eliminată care conține unul dintre nucleii din procesul de diviziune, dar aproape că nu are citoplasmă ca urmare a citokinezei inegale.

dalton (Da) Unitate de măsură a masei echivalentă cu cea a atomului de hidrogen , care este de 1,67 x 10^{-24} ^{gram} . Unitate utilizată pentru a desemna greutățile moleculare.

DGV (Baza de date a variantelor genomice) Catalog de variante structurale prezente în genomul uman, inclusiv variații ale numărului de copii și inversiuni.

de nou Ceea ce își are originea din nou; este sintetizat din precursori mai puțin complecși, mai degrabă decât să fi fost produs prin modificarea unei molecule existente.

deget de zinc *:* O clasă de domenii de legare a ADN-ului găsite în proteine. Are un model caracteristic de cisterne și reziduuri de histidină care se complexează cu ionii de zinc, aranjând reziduurile de aminoacizi intermediari în bucle sau secvențe asemănătoare degetelor. deficiență *:* O mutație cromozomială, numită și deleție, care implică pierderea materialului cromozomial .

deleție *(ștergere)* Mutație cromozomială, numită și deficiență, care implică pierderea materialului cromozomial, deme *(deme)* Populație locală cu împerechere liberă.

Densitate flotabilă *:* O proprietate a particulelor (și moleculelor) care depinde de densitatea lor reală, determinată de volumul lor specific parțial și de gradul de hidratare. Aceasta oferă baza pentru separarea moleculelor sau particulelor folosind gradienți de densitate.

Depresie consangvină *:* Scăderea viabilității, vigorii sau creșterii urmașilor - după mai multe generații de consangvinizare.

Depresie asociată cu exogamie *:* Capacitate biologică redusă la urmașii unei încrucișări între părinți distincți genetic. Se crede că este rezultatul unei adaptări scăzute la condițiile locale de mediu. *Deriva genetică:* Variație - aleatorie a frecvențelor alelelor de la o generație la alta, observată cel mai adesea în populații mici.

Dermatoglife *:* Studiul pliurilor superficiale ale pielii, în special ale mâinilor și picioarelor. Deoxiribonuclează (DNază) *:* Un tip de enzimă care descompune ADN-ul în fragmente de oligonucleotide, introducând rupturi monocatenare sau duble în dubla spirală.

Deoxiriboză *(dezoxiriboză)* Zahăr cu cinci atomi de carbon asociat cu dezoxiribonucleotidele ADN - ului.

Deplasare tautomerică *:* O izomerizare reversibilă într-o moleculă cauzată de o deplasare a locației unui atom de hidrogen. În acizii nucleici , deplasările tautomerice ale bazelor nucleotidice pot provoca modificări ale altor baze în timpul replicării și sunt o cauză a mutațiilor.

abatere *standard* Măsură *cantitativă* a variației dintr -un eșantion a măsurătorilor unei populații, calculată ca rădăcina pătrată a variației, determinare Stabilirea unui model specific de activitate genică și soartă de dezvoltare pentru o anumită celulă, de obicei înainte de orice manifestare a fenotipului viitor al celulei.

diakineză *(diakineză)* Etapa finală a profazei I a meiozei în care cromozomii se încolăcesc strâns, se compactează și se deplasează spre periferia nucleului.

diadă *(diadă)* Produși ai separării sau disjuncției tetradei în prima profază meiotică. Fiecare diadă este formată din două cromatide surori unite prin centromer.

preimplantațional (PGD) Extracția și analiza genetică a ovocitelor nefecundate, a corpilor polari sau a celulelor izolate dintr-un embrion timpuriu (cu vârsta de 3-5 zile).

Diagnosticul genetic prenatal neinvaziv (NIPGD) este o metodă neinvazivă de genotipare fetală care utilizează o probă de sânge matern pentru a analiza mii de loci fetali folosind fragmente de ADN fetal prezente în sângele matern.

Dicer este o enzimă (*o ribonuclează*) care taie ARN-ul dublu catenar (dsARN) și pre-micro ARN-ul (miARN) pentru a forma molecule mici de ARN interferent (siARN) lungi de aproximativ 20-25 de nucleotide, care servesc drept molecule ghid pentru degradarea moleculelor de ARNm cu secvențe complementare siARN-ului.

Dideoxinucleotidă *(dideoxinucleotidă)* Nucleotidă cu un zahăr dezoxiribozic căruia îi lipsește gruparea hidroxil la 3'. Oprește alungirea lanțului atunci când este încorporată **într-** un polinucleotid în creștere și este utilizată în metoda Sanger pentru secvențierea ADN-ului.

Diferențiere *:* Un proces complex de schimbări prin care celulele și țesuturile își ating structura adultă și capacitatea funcțională .

dimer de timină Într -un lanț polinucleotidic, o leziune compusă din două baze timinice adiacente care se unesc printr-o legătură covalentă. De obicei cauzată de expunerea la lumina ultravioletă, această leziune inhibă replicarea ADN-ului.

diploid (2n) *(diploid)* Situație în care fiecare cromozom formează perechi; având câte două cromozomi din fiecare.

parțial diploid *(diploid parțial)* Vezi *merozigot.*

Diplotenă *:* Etapa profazei I a meiozei imediat după pahitenă. În diplotenă, cromatidele surori încep să se separe, iar chiasmele devin vizibile. Acestea migrează lateral spre capetele cromatidelor (terminare).

direcționarea *genelor* O tehnică transgenică utilizată pentru a crea și introduce o genă modificată specific într- un organism. La șoareci, direcționarea genelor implică adesea inducerea unei mutații specifice **într-o genă clonată, care** este apoi introdusă în genomul unui gamet implicat în fertilizare. Organismul rezultat este creat pentru a produce adulți homozigoți pentru mutație, de exemplu, prin eliminarea *unei gene.*

Discordanță *:* În studiile pe gemeni, o situație în care un geamăn exprimă o trăsătură, dar celălalt nu. *Segregare* independentă : Comportamentul independent al fiecărei perechi de cromozomi omologi în timpul segregării lor în meioza I. Distribuția aleatorie a omologilor materni și paterni între gameți.

Distribuție normală *:* O funcție de probabilitate care aproximează distribuția variabilelor aleatoare. Curba normală, cunoscută și sub numele de curbă clopot sau curbă gaussiană, este graficul care reprezintă distribuția normală.

Distrofie *miotonică : O* tulburare neuromusculară progresivă ereditară - caracterizată prin slăbiciune musculară și miotonie (incapacitatea mușchilor de a se relaxa după contracție).

Distrofia musculară Duchenne *(distrofia musculară Duchenne)* este o tulburare genetică recesivă legată de cromozomi, cauzată de o mutație a genei distrofinei, o proteină care se găsește în celulele musculare. Bărbații afectați prezintă slăbiciune și atrofie progresivă a țesutului muscular. Decesul survine de obicei în jurul vârstei de 20 de ani din cauza infecțiilor respiratorii sau a insuficienței cardiace. Distrofina este *o* proteină care se leagă de suprafața interioară a membranei plasmatice în timpul contracției musculare, stabilizând membrana. Mutațiile genei care codifică distrofina duc la distrofiile musculare Duchenne și Becker. Vezi *Distrofia musculară Duchenne.* Disjuncția este *separarea* cromozomilor în timpul anafazei diviziunii celulare.

Diviziune ecuațională *:* O etapă a diviziunii celulare în care numărul de centromeri nu este înjumătățit, ci fiecare cromozom se divide în jumătăți longitudinale care sunt distribuite între doi nuclei fiici. Diviziunea cromozomială în mitoză și în a doua diviziune meiotică sunt exemple de diviziuni ecuaționale. Vezi și *diviziunea reducțională.*

Diviziune reducțională *:* Diviziune a cromozomului care reduce la jumătate numărul de centromeri și, prin urmare, înjumătățește numărul de cromozomi. Prima diviziune a meiozei este reducțională. Vezi și *diviziune ecuațională* .

Dublă helix *:* Model de structură a ADN-ului propus de James Watson și Francis Crick, în care două lanțuri polinucleotidice antiparalele unite prin legături de hidrogen se încolăcesc **într-** o configurație elicoidală dextrogită cu diametrul de 2 nm, cu 10 perechi de baze pe rotație.

Dogmă centrală *:* Conceptul conform căruia fluxul de informații genetice progresează de la ADN la ARN și apoi la proteine. Deși există excepții, această idee este esențială pentru înțelegerea funcției genelor.

dominanță Expresia unui caracter la heterozigot .

Dominanță incompletă *:* Expresia fenotipului heterozigot care este diferit de fenotipul oricăruia dintre părinți homozigoți. Numită și *dominanță parțială* .

dominanță parțială *(dominanță parțială)* Vezi *dominanță incompletă* .

domeniu *proteic* Secvențe de aminoacizi cu conformații și funcții specifice, - distincte din punct de vedere structural și funcțional de alte regiuni din aceeași proteină.

DNază (DNază) dezoxiribonucleozidază; o enzimă care degradează sau descompune ADN-ul în fragmente sau în nucleotidele sale constitutive . Vezi și *endonudază; exonuclează; endonudază de restricție.*

DNaza I (DNaza I) este o nuclează care scindează preferențial ADN-ul la legăturile fosfodiesterice adiacente nucleotidelor pirimidinice . DNaza I poate acționa doar asupra ADN-ului monocatenar sau bicatenar și asupra ADN-ului din cromatină.

duplicație aberație *cromozomială* în care un segment al unui cromozom se repetă.

duplicație genică *:* un eveniment care are ca rezultat producerea unei repetiții în tandem a unei secvențe genetice în timpul replicării.

Editarea ARN *:* Alterarea secvenței nucleotidice a unei molecule de ARNm după transcripție și înainte de traducere. Există două tipuri principale de editare: editarea prin substituție, care modifică nucleotidele individuale, și editarea prin inserție/ștergere, în care nucleotidele sunt adăugate sau șterse.

Efect alosteric *:* Modificare a conformației situsului activ al unei proteine indusă de interacțiunea cu o moleculă efectoare.

efect de poziție *:* modificare a expresiei unei gene asociată cu o modificare a locației genei în genom.

Efectul *fondator :* O formă de derivă genetică. Stabilirea unei populații de către un număr mic de indivizi ale căror genotipuri poartă doar o fracțiune din diferitele tipuri de alele din populația-mamă.

Efect matern *:* Efecte fenotipice asupra urmașilor atribuibile informațiilor genetice transmise prin ovocitul obținut din genomul matern.

Aptitudine biologică *(fitness)* O măsură a supraviețuirii relative și a succesului reproductiv al unui anumit individ sau genotip.

Electroforeză: O tehnică utilizată pentru a separa un amestec de molecule prin migrarea lor diferențială printr-un mediu staționar (cum ar fi un gel) sub influența unui câmp electric. Electroforeză capilară *:* Un grup de metode analitice care separă molecule mici și mari încărcate într- un tub capilar, pe baza raportului lor dimensiune-sarcină. Analiza componentelor separate se efectuează în tubul capilar, de obicei folosind un detector UV. Electroporare *:* O tehnică care utilizează un impuls electric pentru a deplasa moleculele polare peste membrana plasmatică în celulă.

element *transactiv* Un produs genic (de obicei o proteină difuzibilă sau o moleculă *de* ARN) care acționează pentru a regla expresia unei gene țintă; element *IS* Un segment de ADN mobil care se transpune în oricare dintre numeroasele situsuri din genom.

Elementul P *(elementul P)* La *Drosophila,* un element de ADN transpozabil responsabil de disgeneza hibridă.

Element promotor *:* Regiunea reglatoare din amonte de o genă de care se leagă ARN polimeraza înainte de inițierea transcripției.

Element transpozabil *:* Un segment de ADN care se translocă în alte situsuri din genom, în esență independent de omologia secvenței. De obicei, aceste elemente sunt flancate la fiecare capăt de repetiții scurte, inversate, de 20 până la 40 de perechi de baze. Inserția într- o genă structurală poate produce un fenotip mutant. Inserția și excizia elementelor transpozabile depind de două enzime, transpozază și resolvază. Astfel de elemente au fost identificate atât la procariote, cât și la eucariote. Elemente *scurte* intercalate (SINE) *:* Secvențe repetitive găsite în genomurile organismelor superioare, cum ar fi secvența *Alu* de 300 de perechi de baze .

elemente lungi intercalate (LINE) Secvențe *lungi repetitive* găsite în genomul organismelor superioare.

ELSI, program *(Implicații Etice, Legale și Sociale)* Program înființat de Institutul Național de Cercetare a Genomului Uman în 1990 ca parte a Proiectului Genomului Uman pentru a sponsoriza cercetări privind implicațiile etice, juridice și sociale ale cercetării genomice și impactul acesteia asupra indivizilor și instituțiilor sociale.

Împerechere somatică *:* Împerecherea cromozomilor omologi în celulele somatice. Encefalopatie *spongiformă bovină* (ESB *):* O boală cerebrală degenerativă, fatală, la bovine, cauzată de infecția cu prioni. Această infecție este transmisibilă la oameni și la alte animale. Este cunoscută și sub numele de boala vacii nebune.

Endocitoză *(endocitoză)* Includerea de către o celulă a fluidelor, macromoleculelor sau particulelor prin pinocitoză, fagocitoză sau endocitoză mediată de receptori.

consangvinitate *:* Încrucișare între organisme strâns înrudite.

Endomitoză: O creștere a conținutului de ADN la multipli ai numărului haploid care apare în absența diviziunii nucleare sau citoplasmatice. Cromozomii politeni se formează prin endomitoză.

endonuclează *(endonucleză)* Enzimă care hidrolizează legăturile fosfodiesterice interne ale unui lanț polinucleotidic sau ale unei molecule cu lanț simplu sau dublu.

Endonucleză de restricție *:* o nucleză bacteriană care recunoaște secvențe nucleotidice specifice dintr-o moleculă de ADN, adesea un *palindrom,* și taie sau crestează ADN -ul în acele locuri. Aceasta oferă bacteriei o apărare împotriva ADN-ului viral invadator și este utilizată pe scară largă în construirea *moleculelor de ADN recombinant* .

Endopoliploidie *:* creșterea numărului de cromozomi în nucleii somatici rezultată din replicarea prin endomitoză

Boală autoimună *:* Producerea de anticorpi ca urmare a unui răspuns imun la o moleculă , celulă sau țesut care nu face parte din organism. Acest răspuns rezultă din incapacitatea sistemului imunitar de a distinge între sine și non-sine. Boli precum artrita, sclerodermia , lupusul eritematos sistemic și diabetul cu debut juvenil sunt considerate exemple de boli autoimune.

legătură covalentă *(legătură covalentă)* Legătură chimică neionică formată prin punerea în comun a electronilor.

Legătură de hidrogen Atracție electrostatică *slabă* între un atom de hidrogen legat covalent de un atom de oxigen sau azot și un atom care conține o pereche de electroni nepartajați.

Legătură fosfodiesteric *:* În acizii nucleici , sistemul de legături covalente prin care o grupare fosfat este atașată la nucleotidele adiacente, extinzându-se de la atomul de carbon 5' al unei pentoze (riboză sau dezoxiriboză) până la atomul de carbon 3' al pentozei nucleotidului vecin. Legăturile fosfodiesterice formează coloana vertebrală a moleculelor de acid nucleic.

legătură peptidică *(legătură peptidică)* Legătură covalentă între gruparea amino a unui aminoacid și gruparea carboxil a unui alt aminoacid .

Testul Ames (*testul Ames)* Test bacterian dezvoltat de Bruce Ames pentru detectarea compușilor mutageni; evaluează revenirea la independența de histidină la bacteria *Salmonella typhimurium.*

Încrucișarea *este* schimbul de material cromozomial (părți ale brațelor cromozomiale) între cromozomii omologi prin rupere și reunificare. Schimbul de material între cromatidele non-surori în timpul meiozei stă la baza recombinării genetice.

încrucișare inegală *:* Încrucișare între doi omologi nealiniați care are ca rezultat faptul că un omolog are trei copii ale unei regiuni, iar celălalt are o copie a acelei regiuni.

dublă **încrucișare** Două evenimente separate de rupere și schimb între cromozomi care au loc în cadrul aceleiași tetrade.

enzimă *:* o proteină sau un complex proteic care catalizează o reacție biochimică specifică prin reducerea energiei de activare necesare în mod normal pentru inițierea reacției; enzimă *de fotoreactivare* (PRE) *:* o exonuclează care catalizează scindarea activată de lumină a dimerilor de timină din ADN, indusă de radiațiile ultraviolete; **epigeneză** *:* ideea că un organism sau un organ se dezvoltă prin apariția și creșterea de noi structuri, spre deosebire de preformaționism, care susține că dezvoltarea este rezultatul asamblării structurilor deja prezente în ou *;* **epigenetică Studiul** modificărilor funcției genelor sau expresiei genelor unui organism care nu sunt atribuibile alterărilor secvenței nucleotidice (mutații) a ADN-ului organismului.

episom *(episom)* În celulele bacteriene, un element genetic circular care se poate replica independent de cromozomul bacterian sau se poate integra și replica ca parte a cromozomului, **epistază (epistază) Interacțiune nereciprocă** între gene non-alelice, astfel încât o genă influențează sau *interferează* cu expresia altei gene , ducând la un fenotip specific.

epitop *(epitop)* Porțiune a unei macromolecule sau celule care produce un răspuns anticorp; determinant antigenic. O celulă sau o moleculă complexă poate conține mai multe dintre aceste situsuri.

echilibru genetic *:* Stare în care frecvențele alele ale unei populații nici nu cresc , nici nu scad; **echilibru punctat** *:* Model în registrul fosil cu perioade lungi de stabilitate a speciilor și perioade scurte punctate de divergență a speciilor.

Eroziune genetică *:* Pierderea diversității genetice într-o populație sau specie.

eroare congenitală a metabolismului *(eroare congenitală a metabolismului)* Tulburare biochimică controlată genetic, de obicei o enzimă defectă care produce un sindrom clinic, **eroare standard** *(eroare standard)* Măsură cantitativă a variației față de medie într-un eșantion de măsurători dintr-o populație .

sferoplast *(* vezi *protoplast).*

Speciație *:* Procesul prin care apar noi specii de plante și animale.

speciație alopatrică *:* proces de speciație asociat cu izolarea geografică.

Speciație cuantică *:* Formarea unei noi specii într-una sau câteva generații printr-o combinație de selecție și derivă genetică. **Specie:** Un grup de indivizi care se pot încrucișa efectiv sau potențial și sunt izolați reproductiv de alte grupuri similare.

Specii surori *:* Specii care sunt aproape identice din punct de vedere morfologic, dar sunt izolate reproductiv unele de altele.

reactive de oxigen (ROS) sunt ioni sau molecule formate prin reducerea incompletă a oxigenului . Acestea includ radicali hidroxil, superoxizi și peroxizi. ROS provoacă leziuni oxidative ADN-ului și altor molecule. *Spliceosomul* este un complex macromolecular nuclear în care au loc reacții de splicing pentru a elimina intronii din pre-ARNm.

Spor *:* Un organism sau corp unicelular închis de un înveliș protector, produs de unele bacterii, plante și nevertebrate; sporii sunt capabili să supraviețuiască în condiții de mediu nefavorabile; pot da naștere unui nou individ prin germinare. La plante, sporii sunt produsele haploide ale meiozei.

Structura proteinelor *cuaternare Tipuri și moduri de interacțiune dintre două sau* mai multe lanțuri polipeptidice dintr-o moleculă proteică.

structură lariat **Structură** formată în timpul procesului pre-ARNm prin formarea unei legături 5'-3' **într-** un intron, ducând la îndepărtarea respectivului intron dintr-o moleculă de ARNm.

structură solenoidală *(structură solenoidală)* Conformație caracteristică a cromatinei eucariote generată prin super-înfășurarea nucleozomilor.

Structura *primară a proteinelor :* Secvența aminoacizilor dintr-un lanț polipeptidic. **Structura** *secundară a proteinelor :* Formațiunile de helix sau foi triplu plisate dintr -un polipeptid , în funcție de legăturile de hidrogen dintre anumiți aminoacizi.

Structura *terțiară a proteinelor :* Conformația tridimensională a unui lanț polipeptidic în spațiu, specificată de *structura primară* a polipeptidei . Structura terțiară atinge o stare de stabilitate termodinamică maximă.

Structura theta *:* O configurație intermediară în replicarea bidirecțională a moleculelor circulare de ADN. Aproximativ la jumătatea ciclului de replicare, produsul intermediar seamănă cu litera grecească theta.

Studii de asociere *la nivelul întregului genom (GWAS)* Analiza variației genetice pe întregul genom, căutând legătura (asocierile) dintre variațiile secvenței ADN și o regiune a genomului care codifică un fenotip specific.

Eucariote *:* Organisme care au nucleu și organite membranoase și ale căror celule se divid prin mitoză și meioză. **Eucromatină** *:* Cromatină sau regiune cromozomială care se colorează slab și este relativ derulată în timpul interfazei ciclului celular. Regiunile eucromatice conțin majoritatea genelor structurale.

Eufenică *:* Intervenție medicală sau genetică pentru a reduce impactul genotipurilor defectuoase.

Eugenică *:* Îmbunătățirea speciei umane prin reproducere selectivă . Eugenia pozitivă se referă la promovarea împerecherii între indivizi despre care se crede că au gene favorabile , iar eugenia negativă se referă la descurajarea împerecherii între cei despre care se crede că au trăsături nedorite .

euploid *(euploid)* Poliploid cu un număr de cromozomi care este un multiplu exact al unui set de cromozomi de bază, **evoluție** *(evoluție)* Descendență cu modificări. Apariția de noi clase de plante și animale din tipuri preexistente .

evoluție *filetică* Transformarea treptată a unei specii în alta în timp ; numită și evoluție verticală .

excluziunea *alelică* În plasmocitele heterozigote pentru o genă a imunoglobulinei, acțiunea selectivă a unei **singure** alele .

exon *(exon)* Segmente de ADN ale unei gene *care* conțin secvențele care, prin transcripție și traducere, sunt reprezentate în cele din urmă în produsul polipeptidic **final** , **exonucleaza** Enzimă care descompune moleculele de acid nucleic prin tăierea legăturilor fosfodiesterice de la capetele 3' sau 5' ale nucleotidelor .

expresivitate Gradul în care **un** fenotip este exprimat pentru o anumită trăsătură .

extract *fără celule* Prepararea fracțiunii celulare **solubile** , obținută prin lizarea celulelor și îndepărtarea particulelor, cum ar fi **nucleul** , membranele și organitele. Este adesea utilizată pentru a efectua sinteza proteinelor prin adăugarea de molecule de ARNm exogene specifice, la capătul C **-terminal** (C - *terminal).* Într **-o** polipeptidă, capătul care are o grupare carboxil liberă pe **ultimul** aminoacid. Prin convenție, formula structurală a polipeptidelor se scrie cu capătul C la dreapta .

factorul asociat transcripției (TAF *)* O proteină care conține domenii de legare a ADN-ului prin care **proteina** se leagă de secvențe specifice de ADN adiacente **genelor** pe care le reglează factorul TAF .

factor de fertilitate *Vezi* factorul *E* **factor de transfer de rezistență (RTF)** *Componentă a* plasmidelor *R* care conferă capacitatea de a transfera plasmida R între celulele bacteriene prin conjugare .

Factorul F (factorul F *)* Plasmidă episomatică a celulelor bacteriene care conferă capacitatea de a acționa ca donatori în conjugare. Vezi și *factor de fertilitate .*

factorul F' (factorul F' *)* Factorul de fertilitate care conține **o** parte a cromozomului bacterian.

Factorul R (plasmida R) [*Factorul R (plasmida R)]* O plasmidă bacteriană care poartă gene de rezistență la antibiotice . Multe plasmide R au două componente: **o** componentă r care poartă **gene** pentru rezistența la antibiotice și factorul de transfer al rezistenței (RTF).

factorul Rh *(factorul Rh)* Sistem antigenic descris pentru prima dată la maimuța rhesus . Indivizii recesivi r/r nu produc **antigene** Rh și sunt Rh negativi, în timp ce indivizii *R/R* și *R/r* produc antigene Rh. Aceștia au antigeni Rh pe suprafața globulelor roșii și sunt clasificați ca Rh pozitivi. Aceasta este baza genetică a tulburării de incompatibilitate imună numită eritroblastoză fetală (boala hemolitică a nou-născutului).

factor sigma *(o)* În ARN polimerază, o subunitate polipeptidică ce recunoaște situsul de legare a ADN-ului pentru **inițierea** transcripției.

fag *(fag)* Vezi *bacteriofag.*

Fag **temperat** : Un bacteriofag care poate deveni **profag** prin integrarea ADN-ului său în cromozomul celulei bacteriene gazdă, făcându-l imunogen. *Fagi* **charonici** : Un grup de fagi lambda modificați genetic, concepuți pentru a fi utilizați ca vectori (purtători) în clonarea ADN-ului exogen. Aceștia sunt numiți după luntrasul din **mitologia greacă** (Charon) care căra **morții** peste râul Styx.

fag virulent *:* un bacteriofag care infectează, se replică în interiorul și lizează celulele bacteriene, eliberând noi particule de fag.

trăsătură *de anemie falciformă:* fenotip prezentat de indivizi heterozigoți pentru alela anemiei falciforme; familie **de gene** *:* **un** set de gene strâns înrudite, derivate dintr-o genă ancestrală comună prin duplicare și divergență de secvență în timp.

Familie multigenică *:* Un grup de gene care descind dintr- **o** genă ancestrală comună, de obicei prin duplicare și divergență ulterioară față de strămoșul comun. Genele globinei sunt un exemplu de familie multigenică.

farmacogenomică *(farmacogenomică)* Studiul modului în care variația genetică influențează acțiunea medicamentelor asupra indivizilor.

Faza litică *:* O situație în care **un** bacteriofag invadează , se reproduce și lizează o celulă bacteriană. Bacteriile lizogene pot fi induse să intre în faza litică. **Fenilcetonurie (PKU)** *: O* boală ereditară umană asociată **cu** incapacitatea de a metaboliza aminoacidul fenilalanină, din cauza pierderii activității enzimei fenilalanin hidroxilază.

fenotip Proprietățile observabile ale unei trăsături controlate genetic .

Fibre fusiforme *:* Fibrile citoplasmatice formate în timpul diviziunii celulare, implicate **în** separarea cromatidelor în timpul anafazei mitozei și meiozei, precum și în mișcarea **lor** către polii opuși ai celulei.

fixare În genetica populațiilor, *o* situație în care toți membrii unei populații sunt homozigoți pentru o anumită alelă.

FISH Vezi *hibridizare fluorescentă in situ.*

Flux genic *:* Schimb treptat de gene între două populații; are loc prin dispersarea gameților sau migrația indivizilor.

f-met Vezi *formilmetionină.*

fundal *genetic* Impactul genomului colectiv al unui organism asupra expresiei unei gene investigate.

Formă replicantă (FR) *:* Molecule de acid nucleic dublu catenar prezente ca intermediari în timpul replicării anumitor virusuri care conțin ARN.

Formilmetionină (f-met) *:* O moleculă derivată din aminoacidul metionină la care a fost atașată o grupare formil la capătul amino-terminal. Este primul monomer utilizat în sinteza tuturor polipeptidelor bacteriene. Este cunoscută și sub numele de N-formilmetionină.

Fragment Okazaki *(fragment Okazaki)* Catene scurte discontinue de ADN produse pe catena întârziată în timpul sintezei ADN-ului.

frecvența *genelor* Procentul de alele de un anumit tip într-o populație.

funcții *de mapare* Formulă matematică care leagă distanțele de pe hartă de frecvențele de recombinare .

fuziune *centrică* Vezi *translocație robertsoniană.*

G0 Stare de nediviziune, dar metabolic activă, în care celulele pot intra din faza G1 a ciclului celular, gamet *(gamet)* Celulă reproducătoare specializată cu un număr haploid de cromozomi.

gamet nerecombinat *(gamet non-crossover)* Gameți ai căror cromozomi nu au suferit recombinare genetică.

gamet patern *(gamet parental)* Vezi *gamet nerecombinat .*

gamet recombinant *(gamet recombinant)* Gamet care conține o nouă combinație de alele produse prin încrucișare în timpul meiozei.

Gemenii *dizigoți* sunt gemeni produși prin două evenimente separate de fertilizare, două ovule fertilizate independent. Sunt cunoscuți și sub denumirea de gemeni fraterni.

gemeni fraterni *(* vezi gemeni dizigoți). gemeni identici *(* vezi gemeni monozigoți) .

Gemenii *monozigoți* sunt gemeni produși printr-o singură fecundare; prima diviziune a zigotului are ca rezultat două celule, fiecare dintre ele dezvoltându-se într-un embrion. Sunt cunoscuți și sub denumirea *de gemeni identici.*

Genă *:* Unitatea fizică fundamentală a ereditării, a cărei existență poate fi confirmată prin variante alelice și care ocupă un locus specific pe cromozom . O secvență de ADN care codifică un singur polipeptid.

Eliminarea genelor *:* Introducerea unei *mutații nule* într-o genă, care este apoi introdusă într-un organism folosind tehnici transgenice, determinând pierderea funcției genei de către organism. Aceasta este adesea utilizată la șoareci. Vezi și *direcționarea genelor.*

genă structurală *(gene structurală)* Genă care codifică o secvență de aminoacizi a unui lanț polipeptidic.

genă letală *(lethalgene)* Genă a cărei expresie duce la moartea prematură a organismului într-o anumită etapă a ciclului său biologic.

Genă subletală *:* O mutație care scade viabilitatea , cu moartea înainte de maturitate la mai puțin de 50% dintre indivizii purtători ai genei.

Genă supresoare tumorală *:* O genă care codifică un produs ce funcționează în mod normal prin suprimarea diviziunii celulare. Mutațiile genelor supresoare tumorale duc la activarea diviziunii celulare și la formarea tumorii.

genealogie *(pedigree)* În genetica umană, o diagramă care prezintă relațiile ancestrale și transmiterea trăsăturilor genetice de-a lungul mai multor generații într-o familie.

generația F, *(F) generație)* Prima generație filială; urmașii care rezultă din prima încrucișare dintr-o serie.

Generația F 2 *(Generația F2)* A doua generație filială; urmașii rezultați din încrucișarea dintre F (.

generație *filială* Vezi *generația F1; generația F2* .

gene *aditive* Vezi *moștenire poligenică.*

gene *de tip pereche-regulă* Gene care sunt exprimate în benzi în jurul embrionului în stadiul de blastoderm în timpul dezvoltării *embrionului de Drosophila.*

Gene de polaritate *a segmentului :* Gene care reglează modelul spațial de diferențiere în cadrul fiecărui segment în timpul dezvoltării embrionilor de Drosophila .

Genetica conservării *:* o ramură a geneticii care se ocupă cu conservarea și menținerea diversității genetice și a speciilor de animale și plante sălbatice în mediile lor naturale.

gene redundante (*gene redundante)* Secvențe genetice prezente în mai mult de o copie per genom haploid (de exemplu, gene ribozomale).

Genetica celulelor somatice *:* Utilizarea celulelor somatice cultivate pentru investigarea fenomenelor genetice folosind tehnici parasexuale care implică fuziunea celulelor din diferite organisme.

Genetica *directă* este tehnica clasică utilizată pentru a identifica o genă care controlează o trăsătură fenotipică atunci când locația genei în genom sau secvența sa de ADN sunt necunoscute. Se realizează prin izolarea alelelor mutante și cartografierea locației genei, de obicei prin analiza recombinării. Odată cartografiată, gena poate fi clonată și studiată la nivel molecular. Această tehnică contrastează cu *genetica inversă.*

Genetică inversă *:* O tehnică experimentală utilizată pentru a descoperi funcția unei gene după ce aceasta a fost identificată, clonată și secvențiată. Gena clonată poate fi abolită (de exemplu, prin direcționarea genelor) sau expresia sa poate fi modificată (de exemplu, prin interferență ARN sau supraexprimare transgenică), permițând studierea fenotipului rezultat. Această tehnică contrastează cu *genetica directă.* Genetica transmiterii : *Domeniul* geneticii care se ocupă de moștenire și de mecanismele prin care genele sunt transferate de la părinți la urmași.

gene *gap Gene* exprimate în domenii contigue de-a lungul axei anteroposterior a embrionului *Drosophila* care reglează procesul de segmentare în fiecare domeniu.

Genetică *:* Ramura biologiei care se ocupă cu studiul variației moștenite. Mai precis, studiul originii , transmiterii și exprimării informației genetice. Genom *:* Setul complet de informații ereditare codificate în ADN-ul unui organism, incluzând atât secvențele care codifică proteine, cât și cele care nu codifică proteine .

Clonarea completă a genomului prin „shotgun cloning": Vezi *clonarea* prin fragmente selectate aleatoriu ale genomului .

genom *sintetic* Un genom format din fragmente de ADN sintetizate chimic și transferat într -o celulă gazdă căreia îi lipsește genom.

Genomică *:* o subdisciplină a domeniului geneticii generată de uniunea biologiei clasice și a biologiei moleculare, cu obiectivul secvențierii și înțelegerii genelor , interacțiunii genelor, elementelor genetice, precum și a structurii și evoluției genomurilor.

Bibliotecă de ADNc O colecție de secvențe de ADNc clonate .

bibliotecă *genomică* O colecție de clone care conține toate secvențele de ADN ale genomului unui organism .

genotip Constituția *alelică* sau genetică a unui organism; adesea, compoziția alelică a uneia sau a unui număr limitat de gene investigate.

ginandromorf *(ginandromorfie)* Individu format din celule cu genotipuri atât masculine, cât și feminine.

girază *(girază)* Vezi *ADN girază.*

grup monofiletic *:* un taxon (grup de organisme) format dintr- un strămoș și toți descendenții săi. Vezi *studiile de asociere la nivelul întregului* genom .

Substanță H *(substanță H)* Grupă carbohidrat prezentă pe suprafața globulelor roșii la care se pot adăuga antigenele A și/sau B. Atunci când nu este - modificată, dă naștere grupei sanguine O.

haploid (s.f.) *(haploid)* Celulă sau organism care are câte un membru din fiecare pereche de cromozomi omologi. Numit și număr de cromozomi gametici.

haploinsuficiență Într -un organism diploid , o situație în care un individ posedă o singură copie funcțională a unei gene, cealaltă fiind inactivată prin mutație, cantitatea de proteină produsă de acea singură copie este insuficientă pentru a produce un fenotip normal, ducând la un fenotip anormal. La om, această afecțiune este prezentă în multe tulburări autozomal dominante.

haplotip *Un* grup de alele de loci strâns legate, purtate de un individ și moștenite în mod normal ca o unitate.

helicază *(helicază)* Vezi *helicază ADN.*

Hemizigoție *(hemizigot)* O afecțiune în care o genă este prezentă într-o singură copie într-o celulă diploidă. Se aplică de obicei genelor de pe cromozomul X al bărbaților heterogametici. Hemofilie *(hemofilie)* O trăsătură legată de cromozomul X la om, asociată cu mecanisme defectuoase de coagulare a sângelui.

hemoglobină (Hb) *(hemoglobină)* Proteină care conține fier, transportă oxigen și se găsește în principal în globulele roșii ale vertebratelor .

Eritabilitate *: O* măsură relativă a gradului în care diferențele fenotipice observate pentru o trăsătură sunt genetice. *Eritabilitate* generală : Proporția variației fenotipice totale dintr-o populație care poate fi atribuită variației genotipice. Ereditate *:* Transmiterea trăsăturilor de la o generație la alta.

Moștenire citoplasmatică *:* o formă non-mendeliană de moștenire în care informația genetică este transmisă prin citoplasmă în loc de nucleu, de obicei prin intermediul unor organite citoplasmatice autoreplicante care conțin ADN, cum ar fi mitocondriile, glandele tiroide etc.

Moștenire cantitativă *(moștenire cantitativă)* La fel ca *moștenirea poligenică* .

Moștenire extranucleară *:* Transmiterea trăsăturilor prin informațiile genetice conținute în organitele citoplasmatice, cum ar fi mitocondriile și glandele tiroide.

Moștenire *influențată de sex :* Expresie fenotipică condiționată de sexul individului. Un heterozigot poate exprima un fenotip la un sex și fenotipul - alternativ la celălalt sex (de exemplu, alopecia androgenetică la om).

Moștenire limitată de sex : o trăsătură care este exprimată doar la un singur sex, chiar dacă trăsătura poate să nu fie legată de cromozomul X.

Moștenire maternă *:* Transmiterea trăsăturilor strict prin intermediul părintelui matern, de obicei datorită ADN -ului găsit în organitele citoplasmatice, mitocondrii sau glandele tiroide.

moștenire multifactorială *(ereditate multifactorială)* Vezi *moștenire poligenică* .

moștenire patroclină *:* o formă de transmitere genetică în care urmașii au fenotipul tatălui.

Moștenire poligenică *:* Transmiterea unei trăsături fenotipice a cărei expresie depinde de efectul aditiv al unei serii de gene.

heterocarion *(heterocarion)* Celulă somatică care conține nuclei de două origini diferite.

heterozigot (*heterozigot)* Individ cu alele diferite la unul sau mai multe loci. Acești indivizi produc gameți diferiți și, prin urmare, nu sunt de rasă pură.

Heterocromatină *:* Regiuni ale cromozomilor care se colorează puternic, se replică târziu și se condensează prematur în interfază.

Heteroduplex *(heteroduplex)* O moleculă de acid nucleic bicatenar în care fiecare catenă polinucleotidică are o origine diferită. Aceste structuri pot fi produse ca intermediari într-un eveniment de recombinare sau prin împerecherea *in vitro* a unor molecule monocatenare complementare.

Hfr Tulpină bacteriană care prezintă o frecvență ridicată de recombinare . Aceste tulpini au un factor F integrat în cromozom, capabil să mobilizeze sau să transfere o parte a cromozomului către o celulă receptoare F.

hibridizare *in situ* (hibridizare in situ *)* Tehnică de localizare citologică a secvențelor de ADN complementare unui acid nucleic sau unui polinucleotid specific.

Hibridizarea genomică *comparativă (CGH)* este o metodă bazată pe cip ADN pentru analiza variațiilor numărului de copii în ADN-ul genomic sau în anumite tipuri de celule, cum ar fi celulele tumorale.

Hibridizarea *fluorescentă in situ* (FISH) *este o* metodă *de hibridizare in situ* care utilizează sonde marcate cu un semnal fluorescent, determinând situsul de hibridizare să emită fluorescență sub lumină ultravioletă. Northern *blot este* o tehnică analitică în care moleculele de ARN sunt separate prin electroforeză și transferate prin acțiune capilară pe o membrană de nailon sau nitroceluloză. Moleculele specifice de ARN pot fi apoi identificate prin hibridizare cu o sondă de acid nucleic marcată.

Southern *blotting* este o tehnică dezvoltată de Edward Southern în care fragmentele de ADN produse prin digestie cu enzime de restricție sunt separate prin electroforeză și transferate prin acțiune capilară pe o membrană de nailon sau nitroceluloză. Fragmente specifice de ADN pot fi identificate prin hibridizare cu o sondă de acid nucleic marcată radioactiv folosind autoradiografia .

Western blot (sau hibridizarea Western *)* este o tehnică analitică în care proteinele sunt separate prin electroforeză în gel și transferate prin acțiune capilară pe o membrană de nailon sau nitroceluloză. O proteină specifică poate fi identificată prin hibridizare cu un anticorp marcat.

hibrid - *individ* rezultat din încrucișarea a doi părinți din două tulpini sau compoziții genetice diferite.

Ipoteza Lyon *:* O propunere care descrie inactivarea aleatorie în dezvoltarea timpurie a cromozomului X patern sau matern în celulele somatice ale mamiferelor femele. Toate celulele fiice au același cromozom X inactivat, rezultând un model mozaic al expresiei genelor cromozomului X.

Ipoteza oscilației *:* O idee propusă de Francis Crick care afirmă că a treia bază a unui anticodon se poate alinia în mai multe moduri, permițându-i să recunoască mai multe baze în codonii ARNm.

Ipoteza tetranucleotidelor *:* Teoria inițială a structurii ADN-ului care propunea că această moleculă era compusă din unități repetitive, fiecare alcătuită din cele patru nucleotide reprezentate de adenină, timină, citozină și guanină.

Ipoteza nulă *(* H0) este ipoteza utilizată în testele statistice care afirmă că nu există o diferență reală între seturile de date observate și cele așteptate. Metodele statistice, cum ar fi analiza chi-pătrat, sunt utilizate pentru a testa probabilitatea asociată acestei ipoteze.

Histonele sunt proteine încărcate *pozitiv care formează* complexe cu ADN-ul din nucleu. Sunt bogate în aminoacizii bazici arginină și lizină și acționează în înfășurarea ADN-ului pentru a forma nucleozomi.

HLA Proteine de suprafață celulară produse de loci de histocompatibilitate și implicate în acceptarea sau respingerea grefelor și transplanturilor de țesuturi și organe.

Structura *Holliday :* În recombinarea ADN-ului, un produs intermediar vizibil la microscopia electronică de transmisie ca o structură în formă de X cu patru regiuni de ADN monocatenare. Homozigot *:* Un individ cu alele identice pentru gena sau genele de interes. Acești indivizi produc gameți identici (în raport cu gena sau genele studiate) și, prin urmare, sunt de rasă pură.

furcă de replicare : *o* regiune în formă de Y pe un cromozom asociată cu situsul de replicare a ADN-ului. amprentă digitală *:* modelul distinctiv de creste și văi pe vârful degetului uman. De asemenea, modelul obținut prin tăierea enzimatică a unei proteine sau a unui acid nucleic și supunerea produsului de digestie electroforezei sau cromatografiei bidimensionale. Vezi și *amprentă digitală.*

Amprentă ADN *:* O tehnică de identificare a unei secvențe de ADN care se leagă de o anumită proteină, bazată pe ideea că legăturile fosfodiesterice din regiunea acoperită cu proteine sunt protejate de digestie de dezoxiribonucleaze. *Amprentă ADN:* O metodă moleculară pentru identificarea unui membru al unei populații sau specii. Modelul unic al fragmentelor de ADN se obține prin digestie cu enzime de restricție, urmată de Southern blotting folosind sonde minisatelit. Vezi și *profilare ADN, secvențe STR.*

Amprentare ADN criminalistică : În anchetele criminalistice, utilizarea unui set standard de repetiții scurte în tandem (STR) pentru a identifica un individ. Vezi și *profilarea ADN.*

Ig Vezi *imunoglobulină.*

Amprentare genomică *:* Procesul prin care exprimarea unei alele depinde de faptul dacă a fost moștenită de la tată sau de la mamă. Numită și amprentă paternă.

in vitro Literalmente, *în sticlă;* în afara organismului viu; având loc într-un mediu artificial.

in vivo Literal, *viu;* care are loc în corpul unui organism viu.

Inactivarea *cromozomului X* La mamiferele femele, întreruperea aleatorie a activității transcripționale a unuia dintre cromozomii X materni sau paterni . Acest eveniment, care apare la începutul dezvoltării, este un mecanism de compensare a dozei, iar toate celulele urmașilor inactivează același cromozom X. Vezi și *Barr, X-body, ipoteza Lyon, XIST.*

inductor *(inductor)* Moleculă efectoare care activează transcripția .

influență maternă *(* vezi *efect matern.)* inginerie genetică *(Inginerie genetică)* Tehnică de modificare a constituției genetice a celulelor sau indivizilor prin eliminarea, inserarea sau modificarea selectivă a unor gene individuale sau a unor grupuri de gene.

imunoglobulină (Ig) *(imunoglobulină)* Tip de proteine serice care au proprietățile anticorpilor.

Imunoprecipitarea cromatinei *(ChIP*) este o metodă analitică utilizată pentru identificarea proteinelor care leagă ADN-ul și care se leagă de secvențele de ADN de interes. În ChIP, se utilizează anticorpi proteici specifici pentru a izola secvențele de ADN care se leagă de aceste proteine. Vezi ChIP *pe cip.*

Întăritor *:* O secvență de ADN care intensifică transcripția și expresia genelor structurale.

Întăritorii pot acționa la o distanță de mii de perechi de baze și pot fi localizați în amonte, în aval sau în interiorul genei pe care o afectează, ceea ce îi diferențiază de promotori. Interacțiunea genelor *:* Producerea de noi fenotipuri prin interacțiunea alelelor unor gene diferite. *Schimb de cromatide surori* (SCE) : Încrucișare care poate avea loc în celule în timpul mitozei și meiozei; implică schimbul reciproc de material cromozomial între cromatidele surori, unite printr-un centromer comun. Astfel de schimburi pot fi detectate otologic după încorporarea BrdU în cromozomii replicanți.

interfață În ciclul celular, intervalul dintre diviziuni.

Interferență *(I) Măsura* gradului în care o încrucișare afectează incidența unei alte încrucișări într-o regiune adiacentă a aceleiași cromatide. Interferența negativă crește probabilitatea unei alte încrucișări; interferența pozitivă scade probabilitatea unei a doua încrucișări.

Intron *:* Orice segment de ADN situat între regiunile care codifică gene . Intronii sunt transcriși, dar nu apar în produsul ARN și nu sunt reprezentați în polipeptida codificată de genă.

inversiune *(inversie)* Aberație cromozomială în care un segment cromozomial a fost inversat.

Inversie paracentrică *: O* inversie cromozomială care nu include regiunea care conține centromerul . Inversie pericentrică *: O* inversie cromozomială care implică ambele brațe ale cromozomului și, prin urmare, include centromerul .

izoaglutinogen *(izoaglutinogen)* Factor sau substanță antigenică prezentă la suprafața celulelor care este capabilă să inducă formarea de anticorpi (de exemplu, antigenele A și B de pe suprafața globulelor roșii umane).

izocromosom *(izocromozom)* Cromozom aberant, cu două brațe identice și loci omoloage .

izotop (*izotop)* Formă alternativă a unui atom, cu proprietăți chimice identice și având același număr atomic, dar care diferă prin numărul de neutroni (și, prin urmare, prin masa sa) conținuți în nucleu.

izotop radioactiv *:* Un izotop instabil cu un număr modificat de neutroni, care emite radiații ionizante în timpul dezintegrării pe măsură ce se transformă într-o configurație atomică stabilă.

izoenzimă Oricare dintre două sau mai multe forme diferite ale unei enzime care au proprietăți chimice identice sau aproape identice, dar diferă prin unele proprietăți, cum ar fi sarcina electrică netă , pH-ul optim, numărul și tipul de subunități *sau* concentrația substratului.

particulă *κ (particula k)* O particulă citoplasmatică care conține ADN găsită în anumite tulpini de *Paramecium aurelia,* capabilă să elibereze o toxină, paramecina, care ucide alte tulpini sensibile. K-RAS O proteină asociată membranei plasmatice, codificată de *gena KRAS.* Această proteină este importantă în evenimentele de transducție a semnalului celular. Alelele mutante ale KRAS sunt oncogene prezente în multe forme de cancer. kilobază (kb) O unitate de lungime constând din 1.000 de nucleotide .

Sindromul *Klinefelter* este o tulburare genetică la bărbați, cauzată de prezența unuia sau mai multor cromozomi X în plus. Bărbații cu gena Klinefelter au de obicei gena XXY în loc de XY. Acest sindrom este adesea asociat cu glandele mamare mărite, testicule mici, infertilitate și, ocazional, dizabilitate intelectuală.

Secvență Kozak *:* O secvență scurtă de nucleotide adiacentă codonului de inițiere și recunoscută ca situs de inițiere a translației în ARNm eucariot. Bucla de inversie *:* O configurație cromozomială rezultată din sinapsa cromozomilor omologi, dintre care unul prezintă o inversie.

Leptotenă *(leptotenă)* Starea inițială a profazei I a meiozei în timpul căreia cromozomii replicați devin vizibili; aceștia sunt adesea aranjați cu unul sau ambele capete ale cromozomilor adunate într-un punct intern al membranei nucleare (numită și configurație buchet).

Genele letale *echilibrate* sunt gene letale recesive, non-alelice, situate pe cromozomi omologi diferiți. Atunci când organismele purtătoare de gene letale echilibrate sunt încrucișate, supraviețuiesc doar urmașii cu genotipuri identice cu cele ale părinților (heterozigoți).

Legea Hardy-Weinberg *:* Principiu conform căruia frecvențele genotipice rămân în echilibru într-o populație infinit de mare, cu împerechere aleatorie și în absența mutației, migrației și selecției.

Legea sumei *:* O lege care afirmă că probabilitatea apariției unuia dintre două rezultate care se exclud reciproc, unde rezultatul respectiv poate fi obținut prin două sau mai multe evenimente, este egală cu suma probabilităților lor individuale.

legea produsului *În* statistică, o lege care afirmă că probabilitatea ca două evenimente independente să se producă simultan este egală cu produsul probabilităților lor independente.

Linkage *:* O situație în care genele sunt prezente pe același cromozom, rezultând în moștenirea lor ca o unitate, cu condiția să nu fie separate prin încrucișare în timpul meiozei.

Legătura *X* Modelul de moștenire rezultat din genele situate pe cromozomul X. *Legătura* Y : Mod de moștenire demonstrat de genele situate pe cromozomul Y.

linkage complet Situație în care două gene sunt situate atât de aproape una de cealaltă încât nu are loc nicio recombinare între ele.

linie germinală *(linie germinală)* Linie de celule embrionare care formează celulele reproducătoare (ovule și spermatozoizi).

liză *(liză)* Dezintegrarea unei celule ca o consecință a rupturii membranei sale.

lizogenie *(lizogenie)* Proces prin care ADN-ul unui fag este reprimat și integrat în cromozomul bacteriei pe care o infectează.

loci de trăsătură cantitativă (QTL) *Două* sau mai multe gene care acționează asupra unei singure trăsături poligenice într-o manieră cantitativă.

majori de histocompatibilitate (MHC) *:* Loci care codifică determinanți antigenici responsabili de specificitatea tisulară. Complexul HLA la om și complexul H2 la șoareci fac parte din complexul MHC. Vezi și *HLA.*

locus (plural, loci) Loc sau loc pe un cromozom unde se află o genă specifică.

locus *complex* Genă în care o serie de pseudoalele înrudite funcțional pot fi identificate prin analiza recombinării (de exemplu, locusul *bithorax* al *Drosophila).*

Harta *cromozomilor* Diagramă care arată amplasarea genelor pe cromozom.

hartă a destinului *Diagramă* a unui embrion care arată locația celulelor a căror soartă de dezvoltare este cunoscută.

exprimată (EST) *Secvența totală* sau o parte din secvența de nucleotide a unei clone de ADNc. EST-urile sunt utilizate ca markeri în construirea hărților genetice.

cadru de citire O secvență liniară de codoni într -un acid nucleic .

Cadru deschis de citire (ORF) *O secvență* de nucleotide organizată în tripleți care codifică secvența de aminoacizi a unui polipeptid, incluzând un codon de start și un codon de stop.

material cu reacție *încrucișată* (CRM *)* formă nefuncțională a unei enzime, produsă de o genă mutantă, care este recunoscută de anticorpi împotriva enzimei normale .

Mecanism de izolare *:* Orice barieră în calea fluxului genetic între populații distincte ale unui grup de organisme. În general, izolarea poate fi clasificată ca spațială, de mediu sau reproductivă.

de izolare postzigotică *:* Un factor care previne sau reduce schimbul genetic acționând după fertilizare, producând hibrizi neviabili , sterili sau slab adaptați.

Mecanism de izolare precopulatorie *:* Un factor care reduce încrucișarea prin evitarea curtării , împerecherii sau fertilizării.

medie *(medie)* Medie aritmetică.

mediană *(mediană)* Într-un set de valori de date, valoarea peste și sub care există un număr egal de date sau măsurători.

Mediu minimal *:* Un mediu care conține doar nutrienții esențiali necesari pentru creșterea și reproducerea tulpinilor de tip sălbatic ale unui organism. De obicei, este compus din componente anorganice, inclusiv o sursă de carbon și azot.

Meioză: Procesul de diviziune celulară în gametogeneză sau sporogeneză, în timpul căruia numărul diploid de cromozomi este redus la numărul haploid.

merozigot *:* O celulă bacteriană parțial diploică care conține, pe lângă propriul cromozom, un fragment cromozomial introdus în celulă prin transformare, -transducție sau conjugare. metabolism *:* Ansamblul proceselor chimice prin care celulele vii se creează și se mențin. În special , baza chimică prin care organismele vii generează și utilizează energie.

metafază *(metafază)* Fază a diviziunii celulare în care cromozomii condensați sunt situați într-un plan central între cei doi poli ai celulei și în timpul căreia cromozomii sunt atașați de fibrele fusului de asamblare.

Metagenomică *:* Studiul ADN-ului recuperat din organismele colectate din mediu , spre deosebire de cele cultivate în culturi de laborator. Este adesea utilizată pentru a estima diversitatea organismelor dintr-o probă de mediu.

metafemelă *(metafemelă)* La *Drosophila,* O femelă slab dezvoltată, cu viabilitate scăzută, la care proporția de cromozomi X față de seturile autozomale depășește 1,0. Numită anterior *superfemelă.*

metamal *(metamal)* La *Drosophila,* un mascul subdezvoltat cu viabilitate scăzută , la care proporția de cromozomi X față de autozomi este mai mică de 0,5. Numit anterior *supermascul.*

metastază *(metastază)* Proces prin care celulele canceroase se răspândesc din tumora principală și creează tumori maligne în alte părți ale corpului.

Metilarea *este* transferul enzimatic al grupărilor metil de la S-adenozilmetionină la molecule biologice, cum ar fi fosfolipidele, proteinele, ARN-ul și ADN-ul. Metilarea ADN-ului este asociată cu reglarea expresiei genelor și cu fenomene epigenetice, cum ar fi imprimarea genetică.

MHC Vezi *loci majore de histoincompatibilitate.*

microARN *(microARN)* Molecule de ARN monocatenare cu o lungime de aproximativ 20-30 de nucleotide care reglează expresia genelor prin participarea la degradarea ARNm. microsatelit *(microsatelit)* O secvență de ADN scurtă, extrem de polimorfă, cu o lungime de 1-4 perechi de baze, distribuită pe scară largă în tot genomul, utilizată ca marker molecular în diverse metode. Numite și *repetiții simple de secvență (SSR).*

Minisatelit *:* O serie de secvențe scurte de repetiții în tandem (STR) , cu o lungime de 10 până la 100 de nucleotide, distribuite pe scară largă în genomul eucariot. Numărul de repetiții la fiecare locus este variabil; aceste loci sunt cunoscute sub numele de repetiții în tandem cu număr variabil (VNTR). Acestea sunt utilizate în tehnicile de amprentare și profilare a ADN-ului. Vezi și *secvențele STR și VNTR.*

mitocondrii *(mitocondrii)* Centrala energetică a celulei - o organită citoplasmatică autoreproducătoare care conține ADN în organismele eucariote și este implicată în generarea compusului cu energie ridicată ATP .

mitogen *(mitogen)* Substanță care stimulează mitoza în celulele care nu se divid.

Mitoză: Un tip de diviziune celulară care are ca rezultat două celule fiice identice genetic cu celula-mamă - adică producerea a două celule dintr-o singură celule, fiecare având aceleași complemente cromozomiale ca și celula-mamă.

modă *(modă)* Într -un set de date, valoarea care apare cel mai frecvent.

Modelul cercului rulant *:* Un model de replicare a ADN-ului în care punctul de creștere, sau furca de replicare, se rotește în jurul unei catene matriță circulare; la fiecare pas în jurul cercului, catena nou sintetizată deplasează catena replicată anterior, producând o serie de copii contigue ale catenei matriță.

model cu fibre pliate *:* un model de organizare a cromozomilor eucarioți în care fiecare cromatidă soră este compusă dintr-o singură fibră de ADN dublu catenară și proteine, care este pliată ca un ghem de fire strâns înfășurat.

Modificare post-translațională *(modificare post-translațională)* Prelucrare sau modificare a lanțului polipeptidic tradus , prin tăiere enzimatică sau prin adăugarea de grupări fosfat, lanțuri carbohidrați sau lipide.

Modificare *post-transcripțională :* Modificări aduse moleculelor de pre-ARNm în timpul conversiei în ARNm matur. Acestea includ adăugarea unui capac metilat la capătul 5' și a unei cozi poli-A la capătul 3', excizia intronilor și îmbinarea exonilor. **Matrice** *:* Molecula de ARN sau ADN monocatenară care specifică secvența unei catene de nucleotide complementare sintetizată de ARN sau ADN polimerază.

moleculă *efectoare* O moleculă mică, biologic activă, care reglează activitatea unei proteine prin legarea la un situs receptor specific de pe proteină.

monosomică *(monosomie)* în care a fost pierdut un membru al unei perechi de cromozomi; având un număr de cromozomi de *2n* = 1.

motiv helix **-coșură -helix În** proteinele care leagă ADN-ul , structura unei regiuni în care o rotire a patru aminoacizi menține cele două helixuri *în* unghi drept una față de cealaltă.

Prelevarea *de vilozități coriale* (CVS *)* este o tehnică de diagnostic prenatal care prelevează celule fetale intravaginale din corion și le utilizează pentru a detecta defecte citogenetice și biochimice la nivelul embrionului.

mutație *(mutație)* Proces care dă naștere unei modificări a ADN-ului sau a structurii unui cromozom; în gene, originea majorității alelelor .

[**mutație condiționată**] O mutație care este exprimată numai în anumite condiții; adică exprimă un fenotip de tip sălbatic în anumite condiții (permisive) și un fenotip mutant în alte condiții (restrictive). [**mutație cromozomială** *]* Procesul care are ca rezultat duplicarea, ștergerea sau rearanjarea - conținutului diploid de cromozomi ai unui organism. Vezi și *aberație cromozomială.*

Mutație de tip missense : *o* mutație care modifică un codon cu cel al unui aminoacid diferit, provocând astfel o substituție a aminoacizilor din proteina tradusă . Astfel de modificări pot face proteina nefuncțională .

Mutație cu schimbare de cadru de citire *: Un* eveniment mutațional care duce la inserarea uneia sau mai multor perechi de baze într-o genă, deplasând cadrul de citire al tuturor codonilor care urmează situsului mutației. **Mutație** *cu câștig de funcție :* O mutație care produce un fenotip diferit de cel produs de alela normală și de cele produse de alelele cu pierdere de funcție .

Mutație cu pierdere de funcție *:* Mutații care produc alele ce codifică proteine cu funcție redusă sau fără funcție.

mutație spontană *(mutație spontană)* Mutație neindusă de agenți mutageni .

mutație *genetică* . Vezi *mutație punctuală.* **mutație** *homeotică .* O mutație care determină un țesut destinat în mod normal să formeze un anumit organ sau o parte a corpului să își modifice calea de diferențiere și să formeze o structură diferită .

mutație *driver* O mutație care apare într-o celulă canceroasă și contribuie la progresia unei tumori.

mutație dominantă negativă *(mutație dominantă negativă)* Mutație ai cărei produși genici acționează în opoziție cu produșii genici normali, de obicei prin legarea de aceștia pentru a forma dimeri.

mutație neutră *:* o mutație care nu are o semnificație adaptivă imediată sau un efect fenotipic

mutație *preadaptivă* O mutație care ulterior capătă semnificație adaptivă.

Mutație punctuală *:* O mutație care poate fi mapată la un singur locus. La nivel molecular, o mutație care rezultă din substituția unui nucleotid cu altul. Se mai numește și mutație *genetică.*

la **temperatură** *:* o mutație condiționată care produce un fenotip mutant într-un interval de temperatură și un fenotip de tip sălbatic într-un alt interval de temperatură.

Mutație nonsens *:* o mutație care modifică un codon care specifică un aminoacid într-un codon stop , ducând la terminarea prematură în timpul traducerii ARNm.

mutație *somatică* O mutație neereditară care apare într-o celulă somatică.

mutație supresoare *:* o mutație care restabilește (complet sau parțial) funcția pierdută în urma unei mutații anterioare în altă parte.

Mutageneză *dirijată* . Vezi *direcționarea genelor.*

Mutageneză direcționată **pe situs :** Un proces care utilizează un oligonucleotid sintetic care conține o bază sau o secvență mutantă ca primer pentru a introduce o mutație la un situs specific dintr-o genă clonată.

mutagen *(mutagen)* Orice agent care duce la o creștere a ratei mutațiilor spontane.

mutant *(mutant)* O celulă sau un organism care poartă o alelă alterată sau mutantă.

muton *(muton)* În analiza structurii fine a genelor, cea mai mică unitate de mutație corespunzătoare unei singure schimbări de bază.

Nondisjuncție *:* O eroare în timpul diviziunii celulare în care cromozomii omologi (în meioză) sau cromatidele

surori (în mitoză) nu reușesc să se separe și migrează la poli opuși; responsabilă pentru defecte precum monosomia și trisomia. Vezi *regiunea organizatoare* nucleolară .

nuclează *(nuclează)* Enzimă care rupe legăturile moleculelor de acid nucleic.

Nuclează Sj (*nuclează Sj)* Deoxiribonuclează care taie și clasifică moleculele de ADN monocatenar.

nucleu *(nucleu)* Organelă citoplasmatică a celulelor eucariote care conține cromozomii și nucleolul .

nucleoid (*nucleoid)* Regiune din citoplasma celulelor procariote care conține ADN.

nucleolul este locul nuclear al biosintezei și asamblării ribozomale; în mod normal asociat cu sau format în asociere cu ADN-ul care formează *regiunea organizatoare nucleolară* .

nucleozid În nomenclatura chimică a acizilor nucleici , o bază *purinica* sau pirimidinică legată covalent de o moleculă de zahăr riboză sau dezoxiriboză.

nucleozom La eucariote, un complex nuclear format din patru perechi de molecule de histonă înconjurate de două spire ale unei molecule de ADN. Structura principală asociată cu organizarea cromatinei în nucleu, un *nucleotid.* În nomenclatura chimică a acizilor nucleici, o nucleozidă legată covalent de una sau mai multe grupări fosfat. Nucleotidele care conțin o singură grupare fosfat atașată la atomul de carbon 5' al ribozei sau dezoxiribozei sunt componentele acizilor nucleici.

nulisomic *(nullisomie)* Termen care descrie un individ cu o aberație cromozomială în care ambii membri ai unei perechi de cromozomi au fost pierduți.

număr de acces *:* un număr sau cod de identificare atribuit unei secvențe de nucleotide sau aminoacizi pentru introducerea sa într-o bază de date și catalogarea sa; număr de legătură *:* numărul de încrucișări dintre două catene de ADN circular închis .

Nutrigenomică *:* Studiul modului în care alimentele și componentele lor afectează expresia genelor.

Oligonucleotidă *:* O secvență liniară de aproximativ 10-20 de nucleotide legate prin legături fosfodiesterice 5'-3'. Oligonucleotidă antisens *:* O moleculă scurtă de ARN sau ADN monocatenară care este complementară unei secvențe specifice.

alelelor (ASO *)* Nucleotide sintetice, în general cu o lungime de 15 până la 20 de perechi de baze, care în condiții atent controlate se vor hibridiza doar cu o secvență complementară cu o potrivire perfectă.

OMLM (Online Mendelian Inheritance in Man - Moștenirea Mendeliană Online la Om) este o bază de date care listează toate bolile și tulburările genetice cunoscute cu componente genetice cunoscute. De asemenea, stochează o listă a tuturor genelor umane cunoscute și leagă genele de tulburări genetice.

oncogenă *(oncogenă)* Genă a cărei activitate promovează proliferarea necontrolată în celulele eucariote, de obicei o genă mutantă derivată dintr -o *proto-oncogenă.*

operon *(operon)* Unitate genetică constând dintr -una sau mai multe gene structurale care codifică polipeptide și o genă operator adiacentă care reglează activitatea transcripțională a genei sau genelor structurale.

organism genetic model *(organism genetic model)* Un organism experimental care permite o cercetare eficientă și a cărui genetică a fost studiată temeinic, bazându-se pe premisa că descoperirile pot fi aplicate altor organisme; de exemplu, musca de fructe *(Drosophila mela nogaster)* și șoarecele *(Mus musculus)* sunt organisme model utilizate pentru a studia cauzele și dezvoltarea tulburărilor ereditare la specia umană.

organism modificat genetic (*OMG) O plantă sau un animal care poartă o genă de la o altă specie, transferată în genomul său folosind* tehnologia ADN-ului recombinant și în care gena este exprimată pentru a da naștere unui produs genetic.

organism transgenic *(organism transgenic)* Un organism al cărui genom a fost modificat prin introducerea unor secvențe de ADN străine în linia germinală.

originea replicării *(ori) (originea replicării)* Locuri unde începe replicarea ADN-ului de-a lungul unui cromozom, ortologi *(ortologi)* Gene cu secvențe similare găsite la două sau mai multe specii înrudite care provin din aceeași genă a unui strămoș comun.

palindrom *(palindrom)* În genetică, o secvență de perechi de baze ADN care se citește la fel atât în sens invers, cât și înainte. Deoarece catenele sunt antiparalele una față de cealaltă în ADN, cele două catene se citesc la fel dacă sunt citite de la capătul 5'. De exemplu:

5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Secvențele palindromice apar la locurile de recunoaștere și scindare ale endonucleazelor de restricție.

pahitenă Etapa profazei *I* a meiozei în care cromozomii omologi din sinapsis se divid longitudinal (cu excepția centromerului), rezultând un grup de patru cromatide numit tetradă.

pereche de baze *(pereche de baze)* Vezi *pereche de nucleotide.*

pereche de nucleotide *:* Nucleotide împerecheate prin bazele lor (A cu T sau G cu C) pe catenele opuse ale unei molecule de ADN și ținute împreună prin legături de hidrogen .

Paradoxul valorii C: Paradoxul aparent conform căruia nu există nicio relație între dimensiunea genomului și complexitatea evolutivă a speciilor. De exemplu, valoarea C (cantitatea haploidă a genomului) la amfibieni variază cu un factor de 100.

paralogi Două *sau* mai multe gene ale aceleiași specii generate prin duplicare și divergență ulterioară a aceleiași gene ancestrale.

partenogeneză *(partenogeneză)* Dezvoltarea unui ovul fără fecundare.

Mersul pe cromozomi *:* o metodă de analiză a secvențelor lungi de ADN, în care capătul unui segment de ADN este subclonat și utilizat ca sondă pentru a identifica alte clone care se suprapun cu prima clonă.

PCR cantitativ în timp *real (qPCR) O* variantă a PCR (reacție în lanț a polimerazei

) care utilizează sonde fluorescente pentru a cuantifica cantitatea de produse de ADN sau ARN prezente după fiecare ciclu de amplificare.

Penetranță *:* Frecvența, exprimată procentual , cu care indivizii unui anumit genotip manifestă , cel puțin într-o oarecare măsură, un fenotip mutant specific asociat cu o trăsătură.

Profilarea ADN-ului *:* o metodă care permite identificarea indivizilor utilizând variații ale lungimii secvențelor de ADN cu repetiții scurte în tandem (STR) care sunt distribuite pe scară largă în întregul genom.

Baze de date PharmGKB: Un depozit de informații genetice, moleculare, celulare și genomice despre indivizii care au participat la studii clinice de cercetare farmacogenomică. Este conceput pentru a ajuta cercetătorii să studieze modul în care variația genetică între indivizi contribuie la diferențele în răspunsul la medicamente în cadrul unei populații.

Pilus: Proiecție filamentoasă de la suprafața unei celule bacteriene . Adesea asociată cu celule care posedă factori F. În celulele bacteriene care posedă un factor F, o proiecție filamentoasă care joacă un rol în conjugare .

Pirosecvențierea este *o* metodă de secvențiere a ADN-ului de mare randament care determină secvența unei molecule de ADN monocatenar prin sintetizarea unei catene complementare. În timpul sintezei, secvența este determinată prin detectarea chemiluminiscentă a pirofosfatului eliberat pe măsură ce nucleotidele sunt încorporate în catena de ADN nou sintetizată.

placă ecuatorială Vezi *placă metafazică.*

placă metafazică (*placă metafazică)* Aranjamentul cromozomilor mitotici sau meiotici la ecuatorul celulei în timpul metafazei.

germoplasmă *(germoplasmă)* Material ereditar care se transmite din generație în generație.

plasmidă *(plasmidă)* Moleculă de ADN circulară extracromozomială care se replică independent de cromozomul gazdă .

Plasmidă Ti *(plasmida Ti)* O plasmidă bacteriană utilizată ca vector pentru transferul de ADN străin în celulele vegetale, pleiotropie *(pleiotropie)* Situație în care o singură mutație produce simultan mai multe efecte fenotipice.

ploidie *(ploidie)* Termen care se referă la dotarea cromozomilor de bază sau la multiplii ai acestei dotări.

pluripotent *(pluripotent)* Vezi *totipotent.*

populație Grup *local* de indivizi aparținând aceleiași specii și care se încrucișează efectiv sau potențial.

Polimeraze *(polimeraze)* Enzime care catalizează formarea ADN-ului și ARN-ului din dezoxiribonucleotide , respectiv ribonucleotide.

polimorfism Existența a două sau mai multe fenotipuri discontinue *care* segregă într-o populație.

Polimorfism cromozomial *:* Prezența structurilor alternative sau a rearanjărilor unui cromozom la membrii unei populații. Polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție (RFLP) *:* Variația lungimii fragmentelor de ADN generate de endonucleazele de restricție. Aceste variații sunt cauzate de mutații care creează sau elimină situsuri de tăiere pentru enzimele de restricție. RFLP-urile sunt moștenite codominant și sunt extrem de utile ca markeri genetici.

cu un singur nucleotid (SNP) *:* O variație a unei singure perechi de nucleotide dintr-o moleculă de ADN detectată în timpul analizei genomice. Prezent în cel puțin 1% dintr-o populație, un SNP este util ca marker genetic.

Polimorfism echilibrat *:* Polimorfism genetic menținut într-o populație prin selecție naturală. Polimorfism genetic *:* Coexistența stabilă a două sau mai multe genotipuri discontinue pentru o anumită trăsătură într- o populație. Când frecvențele celor două alele pentru acea trăsătură ating echilibrul, situația se numește polimorfism echilibrat.

polinucleotidă *:* o secvență liniară de 20 sau mai multe nucleotide legate prin legături fosfodiesterice 5'-3'. Vezi și *oligonucleotidă.*

Polipeptidă *:* O moleculă formată din aminoacizi legați prin legături peptidice covalente. Acest termen este folosit pentru a se referi la lanțul de aminoacizi înainte ca acesta să își asume configurația tridimensională funcțională.

poliploid *Celulă* sau individ care are mai mult de două seturi haploide de cromozomi.

Vezi polisom .

Polisom *:* O structură formată din doi sau mai mulți ribozomi asociați cu ARNm implicat în translație. Numită și *poliribosom.*

purtător *:* Un individ heterozigot pentru o trăsătură recesivă.

purtător *de translocație echilibrat* Un individ cu o translocație cromozomială în care a avut loc un schimb de informații genetice, fără niciun material genetic suplimentar asociat cu aceasta și fără niciun material genetic lipsă.

preformaționism *(preformaționism)* Vezi *epigeneză.*

Prion *:* Un agent patogen infecțios lipsit de acizi nucleici și compus în principal dintr-o proteină, PrP, cu o greutate moleculară de 27.000 până la 30.000 de daltoni. Se știe că prionii provoacă scrapie, o boală neurodegenerativă la ovine; encefalopatie spongiformă bovină (sau boala vacii nebune) la bovine; și boli similare la oameni, cum ar fi boala Kuru și boala Creutzfeldt-Jakob.

probabilitate *(probabilitate)* O modalitate de a exprima posibilitatea matematică ca un anumit eveniment să se producă sau nu.

testare Un individ care face obiectul unui studiu genetic ce duce la construirea unui pedigree utilizat pentru a analiza moștenirea unei trăsături de interes determinate genetic. Cunoscut anterior sub numele de *propositus.*

Procariote *(procaiote)* Organisme cărora le lipsește membrana nucleară și cromozomi adevărați. Bacteriile și cianobacteriile sunt exemple de organisme procariote.

Un profag este genomul unui bacteriofag integrat într-un cromozom bacterian, care se replică odată cu cromozomul bacterian. Celulele bacteriene care poartă propagă se consideră a fi *lizogene* și capabile să intre în *ciclul citokinelor,* în care fagul se replică.

urmași *(progenie)* Descendent produs printr-o încrucișare, raport de sexe *(raport de sexe)* Vezi *raportul de sexe primar* și *raportul de sexe secundar.*

raportul *primar al sexelor* Raportul dintre masculi și femele în momentul fertilizării, exprimat de obicei sub formă zecimală (de exemplu, 1,06).

raportul *sexual secundar* Proporția dintre bărbați și femei la naștere, exprimată de obicei ca zecimal (de exemplu, 1,05). propositus Vezi *proving.*

Proteină *:* O moleculă compusă dintr-una sau mai multe polipeptide, formate din aminoacizi legați covalent . Proteinele prezintă *structuri primare, secundare, terțiare* și adesea cuaternare.

Vezi CAP *(proteină* activatoare de catabolit).

Proteine de derulare *:* Proteine nucleare care acționează în timpul replicării ADN-ului pentru a destabiliza și derula spirala ADN înaintea furcii de replicare.

proteine de legare *monocatenare (SSB)* În replicarea ADN-ului, proteinele se leagă și stabilizează regiunile monocatenare ale ADN-ului care rezultă din acțiunea de decoalare a proteinelor.

Proteină represoară lac *:* O proteină care se leagă de operatorul din operonul *lac* și blochează transcripția. Proteom *:* Setul complet de proteine exprimate de o celulă, țesut sau organism la un moment dat.

proteomică *:* Studiul proteinelor exprimate într-o celulă la un moment dat.

Protooncogenă : O genă care în mod normal are rolul *de* a iniția, facilita sau menține creșterea și diviziunea celulară . Protooncogenele pot fi convertite în *oncogene* prin mutație.

protoplast *(protoplast)* O celulă plantă sau bacteriană din care peretele celular a fost îndepărtat. Uneori numit *sferoplast.* prototrof *(prototrof)* O tulpină (de obicei a unui microorganism) capabilă să crească într- un mediu minimal definit . Tulpinile de tip sălbatic sunt de obicei considerate prototrofe, spre deosebire de *tulpinile auxotrofe.*

Proiectul HapMap *:* Un efort internațional al geneticienilor pentru a identifica haplotipurile (markeri genetici strâns legați de același cromozom) comuni de anumite persoane, ca o modalitate de a facilita efortul de identificare, cartografiere și izolare a genelor asociate cu boli sau susceptibilitate la boli .

Proiectul Genomului Personal *:* Un proiect de recrutare a 100.000 de persoane dispuse să își împărtășească secvența genomică, informațiile personale și istoricul medical cu cercetătorii și publicul larg, pentru a facilita înțelegerea modului în care genetica și factorii de mediu contribuie la trăsăturile genetice.

test de alelism *Vezi testul* de completare .

Test de complementare *:* Un test genetic pentru a determina dacă două mutații apar în cadrul aceleiași gene (sau cistron). Dacă două mutații sunt introduse simultan într-o celulă și se produce un fenotip de tip sălbatic (adică se completează reciproc), acestea nu sunt de obicei alelice. Dacă se produce un fenotip mutant, mutațiile nu sunt complementare și sunt de obicei alelice.

Testul de fluctuație *:* o analiză statistică dezvoltată de Salvatore Luria și Max Delbrück pentru a demonstra că mutațiile bacteriene apar spontan, spre deosebire de a fi induse de agenți selectivi.

test sintetic În genetica celulelor somatice , o metodă pentru a determina dacă două gene sunt situate pe același cromozom.

pseudoalele *(pseudoalele)* Gene care se comportă ca alelele prin complementare, dar care pot fi separate prin recombinare.

pseudodominanță Expresia unei alele recesive *la* un omolog prin deleția alelei dominante la celălalt omolog.

Pseudogenă *:* O genă nefuncțională cu omologie de secvență cu o genă structurală cunoscută, situată oriunde în genom. Aceasta diferă de rudele sale funcționale prin inserții sau deleții și prin prezența unor secvențe repetitive directe flancante de 10 până la 20 de nucleotide.

Puf cromozomial *:* O desfășurare și umflare localizată a cromozomilor politenici, considerată de obicei o reflectare a transcripției active. Punct de control GI *:* Punctul din faza G1 a ciclului celular în care o celulă este obligată fie să inițieze sinteza ADN-ului și să continue ciclul, fie să intre în starea de repaus G0. Puncte fierbinți de mutație *:* Regiunile genomice în care se observă mutații cu o frecvență ridicată. Aceste mutații includ o predispoziție către substituții cu un singur nucleotid sau încrucișări inegale .

Scorul *LOD* (*logaritmul probabilității) este* o metodă statistică utilizată pentru a determina dacă două loci sunt legate. Un scor LOD de 4 indică faptul că legătura este de 10.000 de ori mai probabilă decât nelegatura . Prin convenție, un scor LOD de 3 până la 4 indică legătura.

Chiasmă *(chiasmă)* Încrucișare a filamentelor cromatidelor nesurori observată în diplotena primei diviziuni meiotice. Este considerată o dovadă citologică a schimbului de material cromozomial sau a încrucișării.

Chemotaxie *(chemotaxie)* Mișcarea unei celule sau a unui organism ca răspuns la un gradient chimic.

rad Unitate de doză de radiație absorbită cu o energie egală cu 100 erg pe gram de țesut iradiat.

Șoarecii *knockout sunt* șoareci creați printr- un proces în care o genă normală clonată este inactivată prin inserarea unui marker (cum ar fi o genă de rezistență la antibiotice) și transferată în celule stem embrionare, unde

gena modificată va înlocui gena normală (în unele celule). Aceste celule sunt injectate într-un embrion în stadiu de blastomer, producând un șoarece care este crescut pentru a produce șoareci homozigoți pentru gena mutată. Vezi și *direcționarea genelor.*

rasă *Un* subgrup distinct din punct de vedere genotipic sau geografic în cadrul unei specii.

Reacția în lanț a polimerazei (PCR) *este* o metodă de amplificare a segmentelor de ADN care depinde de cicluri de denaturare, împerechere de primeri și sinteză a ADN-ului dirijate de ADN polimerază. Receptorul factorului de creștere epidermală *(EGFR)* este un receptor de suprafață celulară pentru proteinele aparținând familiei factorilor de creștere epidermală. Legarea unui factor de creștere la receptor stimulează o cale de transducție a semnalului. La om, această proteină este codificată de *gena HER,* iar alelele mutante sunt asociate cu cancerul.

recesiv *(recesiv)* Alelă a cărei expresie genică potențială este ascunsă la indivizii heterozigoți de alela dominantă , recombinare *(recombinare)* Proces care dă naștere la formarea de noi combinații alelice pe cromozom, recon *(recon)* Termen utilizat în studiile de analiză a structurii fine pentru a denumi cele mai mici unități genetice între care poate avea loc recombinarea.

Redundanță genetică *:* Prezența mai multor gene în genomul unui organism, toate având variații ale aceleiași funcții.

regiune *operator* În ADN-ul bacterian, o regiune care interacționează cu o proteină represoare specifică pentru a regla expresia unei gene sau a unui set de gene adiacente .

nucleolară (NOR) Regiune *cromozomială* care conține genele pentru ARNr; se găsește foarte frecvent în asociere fizică cu *nucleolul* .

Regiune pseudoautosomală *: O regiune a* cromozomului Y uman care este reprezentată și pe cromozomul X. Genele situate în această regiune a - cromozomului Y au un model de moștenire care nu se poate distinge de genele autosomale.

regiune *variabilă* Porțiune a unei molecule de imunoglobulină a cărei secvență de aminoacizi prezintă multe diferențe între anticorpii cu specificități diferite.

Regiuni hipervariabile *:* Regiunile moleculelor de anticorpi care se leagă de antigene. Aceste regiuni au un grad ridicat de diversitate în conținutul lor de aminoacizi.

Registrul *de Testare Genetică (GTR)* O bază de date centralizată online, finanțată de guvernul Statelor Unite, pentru a oferi informații despre baza științifică și disponibilitatea testării genetice.

Ceas molecular *(doc molecular):* În studiile evolutive, o metodă care numără numărul de diferențe în secvențele de ADN sau proteine ca modalitate de măsurare a timpului scurs de când două specii s-au îndepărtat de un strămoș comun. Echivalent radiații umane: O doză de radiații care provoacă același efect biologic ca un radiografie de raze X. Remodelarea cromatinei *:* Un proces în care un complex proteic modifică structura cromatinei , rezultând modificări ale stării transcripționale a genelor din regiunea modificată.

Renaturare *:* Procesul prin care o proteină sau un acid nucleic denaturat își recapătă structura tridimensională normală.

renaturare *(recoacere)* Formarea moleculelor de ADN bicatenar din catene simple denaturate .

Repararea nepotrivirilor *:* O formă de reparare a ADN-ului prin excizie în care mecanismul de reparare este capabil să distingă între catena care conține eroarea și catena corectă.

Reparare prin excizie *:* Îndepărtarea segmentelor de ADN deteriorate, urmată de reparare. Excizia poate implica îndepărtarea bazelor individuale (reparare baze) sau a unei serii de nucleotide deteriorate (reparare nucleotidelor).

Repararea prin fotoreactivare *este* repararea indusă de lumină a daunelor cauzate de expunerea la lumina ultravioletă. Este asociată cu un sistem enzimatic intracelular.

repetiție terminală *lungă (LTR)* O secvență de câteva sute de perechi de baze găsite la ambele capete ale unui ADN retroviral.

Repetare trinucleotidică *:* Un grup de trei nucleotide (cum ar fi CTG) repetate în tandem în interiorul sau în apropierea unei gene. Anumite boli (distrofia miotonică, boala Huntington) sunt cauzate de o creștere a numărului de copii ale acestor repetiții.

repetiții *scurte în tandem* Vezi *secvențele STR* .

Repetarea în tandem cu număr *variabil (VNTR)* este o secvență scurtă de ADN (2 până la 20 de nucleotide) prezentă ca repetiții în tandem între două situsuri recunoscute de enzimele de restricție. Variația numărului de repetiții creează fragmente de ADN de lungimi diferite după digestia cu enzimele de restricție. Acestea au fost utilizate în versiunile timpurii ale *tehnicilor de amprentare ADN.*

Replicarea *este* procesul prin care ADN-ul este duplicat. Replicarea *bidirecțională* este un mecanism de replicare a ADN-ului în care două furci de replicare se mișcă în direcții opuse de la o origine comună de replicare .

Replicare discontinuă a ADN-ului *:* Sinteza ADN-ului în fragmente discontinue pe catena întârziată în timpul replicării. Aceste fragmente, cunoscute sub numele de fragmente Okazaki, sunt ulterior unite prin ligază ADN pentru a forma o catenă continuă.

Replicare semiconservativă *:* Un model de replicare a ADN-ului în care o moleculă bicatenară este replicată astfel încât moleculele fiice sunt formate dintr-o catenă parentală (veche) și o catenă nou sintetizată.

replicon *(replicon)* Unitatea de replicări a ADN-ului, care conține secvențele de ADN necesare pentru inițierea

replicării ADN-ului. La bacterii, întregul cromozom este un replicon.

replisom *(replisom)* Complex proteic, inclusiv ADN polimeraza, care se asamblează la furca de replicare bacteriană pentru a sintetiza ADN.

represie catabolică *:* Inactivare selectivă a unui operon de către produsul metabolic al enzimelor codificate de operonul respectiv.

represor *:* O proteină care se leagă de o secvență reglatoare adiacentă unei gene și blochează transcripția genei. reproducere asexuată *:* Producerea de urmași în absența oricărui proces sexual. reproducere sexuată *:* Reproducere prin fuziunea gameților, care sunt produsele haploide ale meiozei.

Răspuns SOS *:* Inducerea enzimelor în *Escherichia coli* pentru repararea ADN-ului deteriorat. Răspunsul implică activarea unei enzime care scindează un represor, activând o serie de gene implicate în repararea ADN-ului .

Reticul endoplasmatic (RE) Un sistem de organite membranoase din citoplasma celulelor eucariote . În RE rugos, suprafața exterioară a membranelor poate fi acoperită cu ribozomi; în RE neted, nu este.

Retrotranspozon Elemente genetice *mobile* care sunt componente majore ale multor genomuri eucariote, copiate prin intermediul unui intermediar ARN și inserate într-un situs cromozomial îndepărtat. Retrovirus Un tip de virus care folosește ARN ca material genetic și folosește enzima transcriptază inversă în timpul ciclului său de viață .

Reversie *(reversie)* Mutație care restabilește fenotipul de tip sălbatic. RFLP Vezi polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție .

Riboză *(riboză)* Zahăr cu cinci atomi de carbon asociat cu ribonucleotidele - găsite în ARN.

Un ribozom este *o* organită ribonucleoproteică compusă din două subunități, fiecare conținând ARN și proteină. Ribozomii sunt locurile în care codonii ARNm sunt traduși în secvența de aminoacizi a unui lanț polipeptidic .

RNază (RNază) Tip de enzime care hidrolizează moleculele de ARN.

roentgen (R) Unitate de măsură a cantității de radiație care corespunde generării a 2,083 X 10^{9} perechi de ioni într- un centimetru cub de aer la 0°C și o presiune atmosferică de 760 mm de mercur.

SCE Vezi *schimb de cromatide surori.*

Secretor: O persoană care secretă forme solubile de antigene din grupa sanguină A și/sau B prezente în salivă și alte fluide corporale. Această afecțiune este cauzată de o genă autosomal dominantă care nu este legată de locusul ABO .

secvență *cis - acționară:* o secvență de ADN care reglează expresia unei gene situate pe același cromozom. Aceasta contrastează cu un element trans-acționar , unde reglarea este sub controlul unei secvențe de pe cromozomul omolog. Vezi și *element trans-acționar* .

secvență *consens* Secvența de nucleotide din ADN sau secvența de aminoacizi din proteine care este cel mai adesea prezentă într-o anumită genă sau proteină din cadrul unui grup de organisme.

secvență de inserție *Vezi elementul* IS . secvență *intermediară* Vezi *intron.*

secvență *lider* Parte a unei molecule de ARNm de la capătul 5' până la codonul de început, conținând adesea situsuri de legare a ribozomilor sau regulatori.

secvențierea *ADN-ului cu randament ridicat* Un grup de metode de secvențiere a ADN-ului care au un randament de 100 până la 1.000 de ori mai mare decât metoda standard de secvențiere a ADN-ului (Sanger) și care reduc costurile de secvențiere cu peste 99 % . Se mai numește și *secvențiere de generație următoare* .

secvențiere *cu o singură moleculă O* metodă de secvențiere *cu randament* ridicat prin sinteză, care implică secvențierea directă a unor molecule individuale de ADN sau ARN, fără a fi nevoie de amplificare prin PCR înainte de secvențiere.

Secvențiere *care termină lanțul de dideoxinucleotide (secvențiere Sanger)* Vezi *secvențiere Sanger Secvențiere* Sanger Secvențiere ADN prin sintetizarea lanțurilor de ADN care sunt terminate aleatoriu prin încorporarea unui analog de nucleotide (dideoxinucleotide), urmată de determinarea secvenței prin analizarea lungimilor fragmentelor rezultate în fiecare reacție.

Secvențele de replicare autonomă (ARS *)* sunt origini de replicare, cu o lungime de aproximativ 100 de nucleotide, care se găsesc în cromozomii drojdiei. ARS se găsesc și în ADN-ul organelelor.

Secvențele *STR* sunt repetiții scurte în tandem, cu o lungime de 2 până la 9 perechi de baze, care se găsesc în secvențele minisatelit. Aceste secvențe sunt utilizate pentru a pregăti profiluri ADN pentru tehnici criminalistice, testarea paternității și alte aplicații.

Segregare *:* Separarea omologilor materni și paterni din fiecare pereche de cromozomi omologi din gameți în timpul meiozei.

Selecție *:* Modificările care au loc în frecvența alelelor și genotipurilor în populații, ca urmare a reproducerii diferențiale .

Selecție artificială . Vezi *selecție.*

selecție *direcțională* Forță selectivă care modifică frecvența unei alele într-o direcție dată, spre fixarea acesteia sau spre eliminarea acesteia.

selecție *disruptivă* Selecție simultană a extremelor fenotipice ale unei populații, rezultând în mod normal în producerea a două tulpini fenotipic discontinue.

Selecție stabilizatoare *:* Reproducere diferențială a indivizilor cu genotipuri apropiate de media populației. Eliminare selectivă a genotipurilor de la ambele extreme.

Selecție naturală *:* Reproducere diferențială între membrii unei specii care posedă o adaptabilitate biologică variabilă conferită de diferențe genotipice.

semisterilitate *(semisterilitate)* Situație în care un procent din zigoți sunt neviabili .

sexducție *(sexducție)* Transmiterea genelor cromozomiale de la o bacterie donatoare la o celulă receptoare prin intermediul factorului E

Sex heterogametic *:* Sex care produce gameți cu cromozomi sexuali diferiți. La mamifere, sexul heterogametic este masculin.

Sex homogametic *:* Sex care produce gameți care nu diferă în ceea ce privește cromozomii sexuali pe care îi poartă; la mamifere, femela are sexul homogametic. **Secvența Shine-Dalgarno** AGGAGG: secvență de nucleotide - prezentă în secvența lider a genelor procariote care servesc ca situsuri de legare a ribozomilor. ARN -ul 16S al subunității ribozomale mici conține o secvență complementară de care se leagă ARNm-ul.

shugoshine *(shugoshine)* O clasă de proteine implicate în menținerea coeziunii centromerelor cromatidelor surori în timpul mitozei și meiozei.

sinapsis *(sinapsis)* Împerecherea cromozomilor omologi în meioză.

Sincarion *:* Fuziunea a doi nuclei somatici sau gametici. De asemenea, în genetica celulelor somatice, produsul fuziunii nucleare.

Sindrom *:* Un grup de caracteristici sau simptome asociate cu o boală sau o anomalie. O persoană afectată poate exprima unele dintre aceste caracteristici, dar nu neapărat pe toate.

Sindromul Turner (*Sindromul Turner)* O afecțiune genetică la femei cauzată de genotipul 45,X. Acestea au un fenotip feminin , dar sunt sterile deoarece au ovare subdezvoltate .

Cri-du-chat **(sindromul plânsului pisicii)** Un sindrom clinic rar la om, cauzat de deleția unei părți a brațului scurt al cromozomului 5. Bebelușii afectați au un plâns caracteristic care sună ca un mieunat de pisică.

fragil **este** o tulburare genetică umană cauzată de expansiunea unei repetiții a trinucleotidelor CGG și a unui situs fragil la Xq27.3 în cadrul *genei FMR1.* Sindromul X fragil este cea mai frecventă formă de dizabilitate intelectuală la bărbați . Bărbații afectați au trăsături faciale caracteristice și dizabilitate intelectuală. Femeile purtătoare nu prezintă simptome fizice, dar, ca grup, au rate mai mari de dizabilitate intelectuală decât persoanele neafectate.

simbiont *(simbiont)* Organism care coexistă într-o relație reciproc avantajoasă cu un alt organism.

Sistem combinat de indexare a ADN-ului *(CODIS)* Vezi CODIS.

sistem enzimatic *inductibil* Un sistem enzimatic aflat sub controlul unei molecule reglatoare sau inductor, care blochează un represor și permite transcripția.

sistem enzimatic represibil *:* o enzimă sau un grup de enzime a căror sinteză este reglată de concentrația intracelulară a anumitor metaboliți. **situs activ** *: substratul* - situsul de legare al unei enzime ; în alte proteine, partea a cărei integritate structurală este necesară pentru funcționarea sa.

situsuri multiple de clonare *(MCS):* Un segment de ADN conceput să conțină situsuri multiple pentru digestia cu enzime de restricție. Situsurile multiple de clonare se găsesc frecvent în vectorii modificați genetic, cum ar fi plasmidele.

Situs de restricție *:* O secvență de ADN, adesea palindromă, recunoscută de o endonuclează de restricție . Enzima se leagă de situsul de restricție și taie ADN-ul la situsul de restricție.

situs fragil *:* o lacună ereditară sau o regiune necolorată a unui cromozom, în care pot fi induse rupturi cromozomiale.

Situs de reglare *:* secvență de ADN implicată în controlul expresiei altor gene, de obicei implicând o interacțiune cu o altă moleculă.

SNP Vezi *polimorfism cu un singur nucleotid.* **snurps** Vezi *ARN nuclear mic.*

Sondă *:* O macromoleculă de ADN sau ARN marcată care poate fi detectată prin autoradiografie sau microscopie cu fluorescență. Sondele sunt utilizate pentru a identifica moleculele țintă, genele sau produsele genetice.

SRY este o regiune determinantă a sexului a cromozomului Y, situată în apropierea limitei pseudoautozomale a cromozomului. Dovezile acumulate indică faptul că produsul acestei gene este factorul determinant al testiculului (TDF).

subspecie Populație a unei specii cu încrucișare liberă și cu caracteristici morfologice sau geografice diferențiate, **supradominanță** *Fenomen* în care indivizii heterozigoți au un fenotip mai extrem decât orice fenotip al homozigoților.

superfeminin *(* Vezi metafeminin) . **supermascul** *(* Vezi *metamascul).*

Substituție de baze *:* O modificare a unei baze dintr-o moleculă de ADN care produce o mutație. Există două tipuri de substituții: *tranziții,* în care o purină înlocuiește o purină sau o pirimidină înlocuiește o pirimidină; și *transversii ,* în care o pirimidină înlocuiește o purină sau invers, **dimensiunea** *efectivă a populației* Într-o populație, numărul de indivizi cu o probabilitate egală de a contribui cu gameți la următoarea generație.

rata **de mutație Frecvența** cu care apar mutațiile la un anumit locus sau într-o populație. **TDF** (*factor determinant* al testiculului) **Produsul genei SRY** , de pe cromozomul Y , care controlează punctul de decizie în dezvoltare pentru ca o gonadă nediferențiată să se dezvolte într-un testicul .

Tehnologia ADN-ului *recombinant* Un set de metode utilizate pentru a crea molecule de ADN prin ligarea *in vitro* a ADN-ului de la două organisme diferite și replicarea și recuperarea ulterioară a acestor molecule de ADN recombinant.

următoare **(NGS)** . Vezi *secvențierea ADN-ului de mare randament.*

Telofază *:* Faza diviziunii celulare în care cromozomii fiice ajung la polii opuși ai celulei și inversează etapele caracteristice ale profazei , reformând nucleii și derulând cromozomii. Telofază se termină cu citokineza, care divide citoplasma și împarte celula în două. *Telofază I* : În prima diviziune meiotică, când cromozomii duplicați ajung la polii celulelor care se divid.

Telomerază *(telomerază)* Enzimă care adaugă secvențe scurte de ADN, repetate în tandem, la capetele cromozomilor eucarioți.

Telomer *(telomer)* Regiunea terminală heterocromatică a unui cromozom.

Temperatura de topire *(T_m) (profilul de topire)* Temperatura la care jumătate dintr-o populație de molecule de acid nucleic bicatenar se disociază în catene simple.

cromozomială **a moștenirii** *:* o idee propusă independent de Walter Sutton și Theodore Roveri, conform căreia cromozomii sunt purtătorii genelor și stă la baza mecanismului mendelian de segregare și sortare independentă.

Teoria selecției clonale *:* o explicație propusă în imunologie care afirmă că diversitatea anticorpilor precede expunerea la antigen și că antigenul acționează prin selectarea celulelor care conțin anticorpul său specific pentru a prolifera.

Teoria endosimbiotică *:* Propunerea conform căreia organitele celulare autoreplicante, cum ar fi mitocondriile și glandele tiroide, au fost inițial organisme libere care au stabilit o relație simbiotică cu celulele nucleate. Capătul N *-terminal* Gruparea amino liberă a primului aminoacid al unui polipeptid. Prin convenție, formula structurală a polipeptidelor se scrie cu N la stânga. *Terminalizare:* Deplasarea chiasmelor spre capetele cromozomilor în diplotena primei diviziuni meiotice.

Tetradă *:* Cele patru cromatide care alcătuiesc cromozomii perechi în profaza I a diviziunii meiotice . La eucariotele cu un stadiu predominant haploid (unele alge și ciuperci), o tetradă desemnează cele patru celule haploide produse într-o singură diviziune meiotică.

tip *sălbatic* Fenotipul sau genotipul cel mai frecvent observat , desemnat ca normă sau standard.

T_m Vezi *punctul de topire.*

Topoizomerază *(topoizomerază)* Un tip de enzimă care transformă ADN-ul dintr-o formă topologică în alta. În timpul replicării , o topoizomerază, *ADN giraza,* facilitează replicarea ADN-ului prin reducerea tensiunii moleculare cauzate de superînrăsucirea în amonte de *furca de replicare.* **Totipotentă** *(totipotentă)* Capacitatea unei celule sau a unei părți a unui embrion de a genera toate structurile adulte. În mod normal , această capacitate este restricționată progresiv în timpul dezvoltării. Acest termen și termenul *pluripotent* sunt utilizați interschimbabil.

Traducere *:* Generarea secvenței de aminoacizi a unui polipeptid din secvența de baze a unei molecule de ARNm în asociere cu un ribozom și ARNt.

Transcripție *:* Transferul informației genetice din ADN prin sintetizarea unei molecule de ARN complementare folosind un șablon de ADN.

Transcriptază inversă *:* o polimerază care utilizează ARN ca șablon pentru a transcrie o moleculă de ADN monocatenar ca produs.

transcriptom *(transcriptom)* Grup de molecule de ARNm prezente în celulă la un moment dat.

transdeterminare *:* Schimbare a soartei de dezvoltare a unei celule sau a unui grup de celule.

Transducție *:* Recombinare bacteriană mediată de un virus. Este, de asemenea, utilizată pentru a descrie transferul de gene eucariote mediat de retrovirusuri.

Transducție avortată *:* Un fenomen în care o moleculă de ADN transdusă nu este încorporată în cromozomul receptor . Vezi *transducție.*

transducția **semnalului Cale** moleculară intercelulară sau intracelulară prin care un semnal extern este transformat într-un răspuns biologic funcțional.

Transducție specializată *:* Transfer genetic de gene specifice gazdei prin transducția fagilor. Vezi și *transducție generalizată.*

Transducție **generalizată** *:* Transferul oricărei gene de la o gazdă bacteriană la un receptor bacterian într-un proces mediat de un bacteriofag. Vezi și *transducție specializată.*

transducție *restrictivă* Vezi *transducție specializată* .

Transferul orizontal de gene *(THG) este* transferul nereproductiv al informațiilor genetice de la un organism la altul, între specii și taxoni de ordin superior (și chiar domenii). Acest lucru contrastează cu transferul vertical de gene, care este transferul de informații genetice de la părinți la urmași. La unele specii de bacterii și archaea, până la 5 % din genom poate fi dobândit inițial prin transfer orizontal de gene. **Transferul vertical de gene** (*TVG)* este transferul de informații genetice de la părinți la urmași, generație după generație.

Transformare *:* O modificare ereditară a unei celule sau a unui organism cauzată de ADN-ul exogen. Se știe că apare în mod natural și este utilizată și în *studiile ADN-ului recombinant.*

tranziție *(tranziție)* Eveniment mutațional în care o purină este înlocuită cu alta sau o pirimidină este înlocuită cu alta.

Translocație *:* O mutație cromozomială asociată cu transferul reciproc sau nereciproc al unui segment cromozomial de la un cromozom la altul. Este, de asemenea, utilizată pentru a indica mișcarea ARNm prin ribozom în timpul traducerii.

translocație reciprocă *:* o aberație cromozomială în care cromozomii neomologi schimbă părți.

Translocație robertsoniană *:* O aberație cromozomială creată de rupturi în brațele scurte ale doi cromozomi acrocentrici, urmată de fuzionea

brațelor lungi ale acelor cromozomi la nivelul centromerului. Se mai numește și *fuziune centrică.*

transversie *(transversie)* Eveniment mutațional în care o purină este înlocuită cu o pirimidină sau o pirimidină este înlocuită cu o purină.

transpozon neautonom *: Un* element transpozabil căruia îi lipsește o genă funcțională a transpozazei. triploidie *:* O afecțiune în care o celulă sau un organism posedă trei seturi haploide de cromozomi.

trisomie *(trisomie)* Situație în care o celulă sau un organism are două copii ale fiecărui cromozom, cu excepția unuia, din care există trei copii (care este desemnat ca *2n* + 1).

unitate de hartă *:* O măsură a distanței genetice dintre două gene, corespunzătoare unei frecvențe de recombinare de 1%. Vezi și *centimorgan.*

Unitatea coeficientului *Svedberg* (S) O unitate de măsură a vitezei cu care particulele (moleculele) se așează într-un câmp centrifugal. Această rată este ° funcție a mai multor proprietăți fizico-chimice, cum ar fi dimensiunea și forma. O valoare de așezare de 1 x 10^{-1} secunde este definită ca o unitate a coeficientului Svedberg.

Variabilitate genetică *:* O măsură a tendinței genotipurilor indivizilor dintr-o populație de a varia unele de altele. Variabilitatea genetică poate fi măsurată prin determinarea ratei de mutație a unor gene specifice. Variație continuă *:* Variație fenotipică manifestată de trăsături cantitative distribuite de la un fenotip extrem la altul într -o manieră continuă sau suprapusă. *Variație discontinuă:* Un model de variație al unei trăsături ale cărei fenotipuri sunt clasificate în două sau mai multe clase diferite.

Variația numărului de copii (CNV): segmente *de ADN mai mari de* 1 kb care se repetă de un număr variabil de ori în genom. Varianță *s²* *(varianță)* Măsură statistică a variației valorilor în raport cu o valoare centrală, calculată ca pătratul abaterii standard.

Varianță aditivă *:* Varianță genetică atribuibilă substituției unei alele cu alta la un anumit locus. Această varianță poate fi utilizată pentru a prezice rata de răspuns la selecția fenotipică în trăsăturile cantitative.

pestrițerie *(varietate)* Pete cu fenotip distinct, cum ar fi culoarea, pe o țesătură.

Vector: În ADN-ul recombinant , un agent, cum ar fi un fag sau o plasmidă , în care este inserat un segment de ADN străin și care este utilizat pentru a transforma celulele gazdă.

vector de expresie *Plasmide* sau fagi care conțin regiuni promotoare concepute pentru a determina exprimarea secvențelor de ADN inserate.

Viabilitate *:* Capacitatea indivizilor dintr-o anumită clasă fenotipică de a supraviețui, prin comparație cu o altă clasă (de obicei tipul sălbatic).

virusul imunodeficienței umane (HIV) (*virusul imunodeficienței umane* , HIV) Retrovirus uman care conține ARN asociat cu debutul și progresia sindromului imunodeficienței dobândite (SIDA).

VNTR Vezi *repetiții în tandem cu număr variabil.*

XIST Locusul centrului de inactivare a cromozomului X care controlează inactivarea cromozomului X la mamiferele femele .

YAC-urile sunt vectori de clonare sub formă de cromozomi artificiali de drojdie , construiți folosind elemente cromozomiale precum telomeri (dintr-un ciliat), centromeri, origini de replicare și gene marker de drojdie. YAC-urile sunt utilizate pentru a clona segmente lungi de ADN eucariot.

Zeină *(zeină)* Principala proteină de stocare din endospermul porumbului, formată din două proteine principale, cu greutăți moleculare de 19.000 și 21.000 Da.

Credite

CREDITE FOTO

Capitolul 1 Introducere în genetică

Fotografia 1 de deschidere a capitolului: Sinclair Stammers/Photo Researchers. Fotografia 2 de deschidere a capitolului: Mark Smith/ Photo Researchers. Fotografia 3 de deschidere a capitolului: CC-BY- SA foto: Alberto Salguero Quiles, Getafe, España. 1.1: Biblioteca Națională de Medicină. 1.2: Asociații biofoto/Cercetători foto. 1.4ab: Învățarea să zboare: markeri fenotipici la *Drosophila.* Un post al markerilor fenotipici comuni utilizați în genetica *Drosophila* . Jennifer Childress, Richard Behringer și Georg Halder. 2005. Geneza 43(1). Ilustrație de acoperire. 1.5: Biozentrum, Universitatea din Basel/Cercetători foto. 1.9: Oliver Meckes și Nicole Ottawa/ Cercetători foto. 1.11: Institutul Roslin. 1.12: SSPL/The Image Works. 1.14: Fotografie CC-BY-SA: Guillaume Paumier. 1.15a: John Paul Endress, Pearson. 1.15b: Herman Eisenbeiss/Fotocercetători . 1.16a: Jeremy Burgess/Fotocercetători. 1.16b: David McCarthy/SPL/Fotocercetători.

Capitolul 2 Mitoză și meioză

Fotografie de deschidere a capitolului: Andrew S. Bajer, Universitatea din Oregon. 2.2: CNRI/SPL/Cercetători în fotografie. 2.4: David C. Ward, Universitatea Yale. 2.7af: Andrew S. Bajer, Universitatea din Oregon . 2.14a: Biophoto Associates/Cercetători în fotografie. 2.14b: An Drew Syred/SPL/Cercetători în fotografie.

Capitolul 3 Genetica mendeliană

Fotografie de deschidere a capitolului: Imagini din Istoria Medicinii (NLM). 3.NN5.1, 3.NN5.2: Mike Dunton, The Victory Seed Company.

Capitolul 4 Extensii ale geneticii mendeliene

Fotografie de deschidere a capitolului: Juniors Bildarchiv/Alamy. 4.1a: John Kaprielian/Photo Researchers. 4.4bc: Laboratorul Jackson . 4.9: Rosemary Buffoni/iStockphoto. 4.12bc: Învățând să zburăm: Markeri fenotipici la *Drosophila.* Un poster cu markeri fenotipici comuni utilizați în genetica *Drosophila* . Jennifer Childress, Richard Behringer și Georg Halder. 2005. *Genesis* 43(1). Ilustrație de acoperire. 4.14a: Ishihara, Test pentru deficit de culoare. Cortesía de Kanehara & Co., Ltd. Oferit exclusiv în SUA de Graham-Field Health Products, Atlanta, GA. 4.15: Hans Reinhard/Bruce Coleman/Photoshot. 4.16: Debra P. Hershkowitz/Bruce Coleman/Photoshot. 4.17a: Tanya Wolff, Facultatea de Medicină a Universității din Washington. 4.17b: Joel C. Eissenberg, Departamentul de Biochimie și Biologie Moleculară, Centrul Medical al Universității St. Louis. 4.17c, 4.18a: Tanya Wolff, Facultatea de Medicină a Universității din Washington. 4.18b: Steven Hcnikoff, Institutul Medical Howard Hughes, Centrul de Cercetare a Cancerului Fred Hutchinson, Seattle, Washington. 4.19a: Jane Burton/Bruce Coleman/Photoshot. 4.19b: William S. Klug. 4.UN.2: Ralph Somes. 4.UN.2. *J.* James Bitgood, Departamentul de Științe Animale, Universitatea din Wisconsin. 4.UN.2: Ralph Somes. 4.UN.2: J. James Bitgood, Departamentul de Științe Animale, Universitatea din Wisconsin. 4.UN.5: Shout It Out Design/Shutterstock. 4.UN.5: Zuzule/Shutterstock. 4.UN.5: Julia Remezova/Shutterstock.

Capitolul S Cartografierea cromozomilor la eucariote

Fotografie de deschidere a capitolului: James Kezer. 5.16: Shel don Wolff. 5.17b: Biophoto Associates/Photo Researchers. 5.18b: Matthew L. Springer, Universitatea din California, San Francisco. 5.18c: Science Source/Photo Researchers. 5.19b: Namboori B. Raju, Universitatea Stanford . Fig. 3C, pag. 29 din Raju, N. B. 2008. Șase decenii de *Neurospora* biologie ascus la Stanford. *Fung. Biol. Rev.* 22: 26-35.

Capitolul 6 Analiza și cartografierea genetică la bacterii și bacteriofagi

Fotografie de deschidere a capitolului : Charles C. Brinton, Jr. 6.2: Pearson Science. 6.11a: Gopal Murti/SPL/Photo Researchers. 6.13a: M. Wurtz/Biozentrum, Universitatea din Basel/SPL/Photo Researchers . 6.15b: Christine Case. 6.18: William S. Klug.

Capitolul 7 Determinarea sexului și cromozomii sexuali

Fotografie de deschidere a capitolului: Wellcome Trust Medical Photographie Library. 7.1b: Biophoto Associates/Photo Researchers. 7.2b: Artem Solovev/Fotolia. 7.3a: María Gallegos, Universitatea din California, San Francisco. 7.5ab: Greenwood Genetic Center (GGC). 7.6ab: Catherine G. Palmer. 7.8ab: Michael Abbey/Photo Researchers. 7.10a: Sari O'Neal/Shutterstock. 7.10b: William S. Klug. 7.13: Compensarea dozei: începutul și sfârșitul generalizării. *Nature Reviews/Genetics,* vol. 8, ianuarie 2007. Peter Becker, Universitatea din München. 7.UN02: Texas A & M University/AP Images.

Capitolul 8 Mutații cromozomiale: variația numărului și aranjamentului cromozomilor

Fotografie de deschidere a capitolului : Institutele Naționale de Sănătate. 8.2: Arco Images GmbH/Alamy. 8.3a: Centrul Genetic Greenwood (GGC). 8.3b: Kristy-Anne Glubish/Design Pics/Alamy. 8.5: David D. Weaver, MD, Universitatea Indiana. 8.9: Consiliul Național al Bumbacului din America. 8.12a: Prin amabilitatea Universității din Washington

Patologie în Centrul Medical. 8.12b: Ray Clarke, Grupul de Sprijin pentru Sindromul Cri Du Chat , Regatul Unit. 8.14abc: Mary Lilly/Instituția Carnegie din Washington. 8.18b: Jorge Yunis. De Yunis și Chandler, 1979. 8.19: Christine J Harrison, LRF Citogenetică, Institutul Nordic pentru Cercetarea Cancerului, Universitatea Newcastle , Regatul Unit.

Capitolul 9 Herencia extranuclear

Fotografia de deschidere a capitolului: Forma mitocondriei și numărul de nucleoizi mitocondriali în timpul ciclului celular al *Euglena gracilis*. Y. Hayashi și K. Ueda. *Journal of Cell Science*, 93: 565-570, Copyright © 1989 Company of Biologists. 9.1b: Ryushi Abura. 9.2a: Centrul de Microscopie Electronică Dartmouth . 9.3: Matthew L. Springer, Universitatea din California, San Francisco . 9.4ab: Ronald A. Butow, Departamentul de Biologie Moleculară și Oncologie, Centrul Medical Southwestern al Universității din Texas . 9.6a: Institutul de Oncologie Dana- Farber. 9.7a: Don W. Fawcett/Kahri/ Dawid/Science Source/Photo Researchers. 9.9ab: Alan Pestronk, Departamentul de Neurologie, Facultatea de Medicină a Universității Washington , St. Louis. 9.11a: Laboratorul Kuroda. 9.12: Uwe Irion, Institutul Max- Planck pentru Biologie a Dezvoltării.

Capitolul 10 Structura și analiza ADN-ului

Fotografie de deschidere a capitolului: Richard Megna/Fundamental Photographs . 10.2ab: Bruce Iverson, Microfotografie. 10.4a: Oliver Meckes/Max-Planck-Institut-Tubingen, Recenzie foto . 10.11: M. HF Wilkins. 10.15a: Ken Edward/Science Source /Photo Researchers. 10.19: Fereastra Sistemelor Medicale. 10.20a: William S. Klug.

Capitolul 11 Replicarea și recombinarea ADN-ului

Fotografie de deschidere a capitolului: Gopal Murti/SPL/Photo Researchers. 11.5a: Walter H. Hodge/Peter Arnold/Photolibrary.com. 11.5ab: Figura geneticii *moleculare*, Pt. 1, pp. 74-75, J. H. Taylor (ed.). Drepturi de autor ©1963 și revizuite în 1991 , reprodus cu permisiunea Elsevier Science Ltd. 11.6a: Reprodus din *CELL*, vol. 25, 1981, p. 659, Sundin și Varshavsky, (Figura 1), cu permisiunea Elsevier Science. Prin amabilitatea lui A. Varshavsky. 11.14: Reprodus cu permisiunea lui H. J. Kreigstein și D. S. Hogness, *Lucrările - Academiei Naționale de Științe* 71: 136 (1974), p. 137, fig. 2. 11.15: Harold Weintraub, Institutul Medical Howard Hughes , Centrul de Cancer Fred Hutchinson/ *Biologie Moleculară Esențială* 2e, Freifelder & Malachinski, Jones & Bartlett, Fig. 7-24, pp. 141. 11.18a: David Dressier, Universitatea Oxford, Anglia.

Capitolul 12 Organizarea ADN-ului în cromozomi

Fotografie de deschidere a capitolului: Don. W. Fawcett/Foto Cercetători. 12.1a: M. Wurtz/Biozenlrum, Universitatea din Basel/SPL/Foto Cercetători. 12.ib: William S. Klug. 12.2: Science Sour ce/Foto Cercetători. 12.3: Gopal Murti/SPL/Foto Cercetători. 12.5: Identificarea proteinei Z4 specifice interbandei *Drosophila ca* proteină cu deget de zinc care leagă ADN-ul și determină structura cromozomială . H. Eggert, A. Gortchakov, H. Saumweber. *J Cell Sci.* 15 august 2004 ; l 17 (Pt 18): 4253-64. Epub 3 august 2004. 12.6b: John Ellison, Laboratorul Richardson, Biologie Integrativă, Universitatea din Texas , Austin. 12.7a: Omikron/Foto Cercetători . 12.7b: William S. Klug. 12.8: Oscar L Miller, Jr. 12.11 , 12.12: David Adler/ Departamentul de Patologie al Universității din Washington . 12.16: William S. Klug.

Capitolul 13 Codul genetic și transcripția

Fotografie de deschidere a capitolului: Oscar L. Miller/SPL/Photo Researchers. 13.1a: Bert W. O'Malley, Colegiul de Medicină Baylor . 13.15a: OL Miller, Jr. Barbara A. Hamkalo, CA Thomas, Jr. *Science* 169:392-395, 1970, Asociația Americană pentru Știința Avansată . F:2.

Capitolul 14 Traducere și proteine

Fotografie de deschidere a capitolului: Retipărită de pe coperta revistei Science , vol. 292, 4 mai 2001, Structura cristalină a unui ribozom *Thermus thermophilus* 70S care conține trei ARN-uri de transfer legate (sus) și vederi explodate care prezintă diferitele sale componente moleculare (centru și jos). Imagine furnizată de Dr. Albion Baucom (baucom@biology.ucsc.edu). Drepturi de autor ale Asociației Americane pentru Avansarea Științei. 14.9a: Arhivele Laboratorului Cold Spring Harbor . 14.9b: EV Kiseleva. 14.13: Sebastian Kaulitzki/Shutterstock. 14.19: Kenneth Eward/ BioGrafx/Science Source/Photo Researchers.

Capitolul 15 Mutație genetică, repararea ADN-ului și transpoziție

Fotografie de deschidere a capitolului: MaizeGDB/Prin amabilitatea M. G. Neuffer. 15.15ab: W. Clark Lambert, Universitatea de Medicină și Stomatologie din New Jersey.

Capitolul 16 Reglarea expresiei genelor la procariote

Fotografie de deschidere a capitolului: Fundația de Cercetare Johnson .

Capitolul 17 Reglarea expresiei genelor la eucariote

Fotografia de deschidere a capitolului: T. Cremer, I. Solovei și F. Habermann, Biozentrum (LMU). 17.2b: Klaus Boller/ Cercetători foto.

Capitolul 18 Genetica dezvoltării

Fotografie de deschidere a capitolului: Edward B. Lewis, Institutul de Tehnologie din California. 18.1a: E Rudolf Turner, Universitatea Indiana . 18.1b: din Învățarea zborului : Markeri fenotipici la *Drosophila.* Un poster cu markeri fenotipici comuni utilizați în genetica *Drosophila* . Jennifer Childress, Richard Behringer și Georg Halder. 2005.

Genesis 43(1). Ilustrație copertă. 18.6: Stephen Paddock. 18.8ab: Peter A. Lawrence. 18.9: Jim Langeland, Stephen Paddock și Sean Carroll, Universitatea din Wisconsin, Madison. 18.10: Retipărit cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd.: Fig. 1 la p. 244 din *British Dental Journal* 195: 243–48, 2003. Greenwood, M. și Meechan, J. G. Medicină generală și chirurgie pentru practicienii care interzic tratamentul . Copyright © Macmillan Magazines Limited. 18.1lab: Reprodus cu permisiunea Fig . 2 la p. 766 din *Cell* 89: 765-71, 30 mai 1997. Drepturi de autor © de Elsevier Science Ltd. Imagine oferită de Mike J. Owen. 18.12ab: Reprodusă cu permisiunea lui T. Kaufmann și colab., *Advanced Genetics* 27:309-362, 1990. Imagine oferită de F. Rudolf Turner, Universitatea Indiana. 18.16: Organizarea axelor în timp și spațiu: 25 de ani de perfecționare coliniară. M. Kmila și D. Duboule. *Science* 2003 din v. 301, p. 332. © Asociația Americană pentru Avansarea Științei. 18.17: P. Barber/Custom Medical Stock Photo. 18.18: Elliot M. Meyerowitz, Institutul de *Tehnologie din California,* Divizia de Biologie. 18.19ab: Max-Planck-Institut fur Entwicklungsbiologie. 18.21 d.Hr.: Elliot M. Meyerowitz, Institutul de *Tehnologie din California,* Divizia de Biologie.

Capitolul 19 Cancerul și reglarea ciclului celular

Fotografie de deschidere a capitolului: SPL/Photo Researchers. 19.lab. Institutul Național de Genetică a Sănătății/Ried 8340062. 19.3ab: Manfred Schwab. 19.8a: Gopal Murti/Photo Researchers.

Capitole speciale despre genetica modernă

Genomică și medicină personalizată

CE2a, CE2.2b: Testarea HER-2/neu în carcinomul mamar: o abordare combinată de hibridizare imunohistochimică și fluorescență in situ. R. L. Ridolfi, M. R. Jamehdor, J. M. Arber. *Mod Pathol.* august 2000; 13(8):866–73. CE2.4a: dra_schwartz/iStockphoto. CE2.4b: Paphrag. CE2.5: de pharmgkb.org. Utilizat cu per miso de PharmGKB și la universidad de Stanford. © PharmGKB. CE2.8ab: Copyright 2010. Helicos BioSciences Corporation. To dos los derechos reservados.

Epigenetică

CE3.8: Genisteina maternă modifică culoarea blănii și protejează puii de șoarece Avy de obezitate prin modificarea epigenomelui fetal . DC Dolinoy și colab. *Environ Health Perspect.* Aprilie 2006; 1 14(4):567-72.

Celule mamă

CE4.1a.Frank Geisler/medicalpicture/Alamy. CE4.1b: SPL/Cercetători în domeniul fotografiei. CE4.4: CNRI/SPL/Cercetători în domeniul fotografiei. CE4.7a: Biologie în dezvoltare. Cercetarea neuronilor face un salt înainte. RH Brown Jr. *Science.* 29 august 2008; 321(5893): 1169-70. CE4.9: Facultatea de Medicină a Universității Wake Forest. CE4.11: Clonare reproductivă și terapeutică - Fotografie de Anne Bower și Manfred Baetscher, Laboratorul de bază transgenică, Oregon Health and Science - Universitatea din Portland, Oregon.

Capitolul 20 Tehnologia ADN recombinată

Fotografie de deschidere a capitolului: Pascal Goetgheluck/Photo Researchers. 20.3a: Gopal Murti/SPL/Photo Researchers. 20.5b: Fotografie medicală personalizată. 20.10: Institutele Naționale de Sănătate/ Fotografie medicală personalizată. 20.12ab: Un omolog cdc5+ al unei plante de talie superioară , *Arabidopsis thaliana*. T. Hirayama, K. Shinozaki. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 de noiembrie de 1996; 93(23): 1337 1-6; smochin. 6. 20.13: Societatea Americană pentru Biologie Celulară din Biologie *Moleculară și Celulară* (20: 8536-47). © Societatea Americană pentru Biologie Celulară . Imagine cortesía del Dr. Gideon Dreyfuss. 20.14ac: Hostikka S. L. , Capecchi M. R., The mouse Hoxcll gene: genomic structure and expression pattern. *Meeh Dev.* Enero 1998; 70(1-2): 133-45. 20.16: Autoradiografia unui gel de secvențiere dideoxi este Tra de Marked to Pfizer Inc. Reproducido con permiso.

Capitolul 21 Genomică, bioinformatică și proteomică

21.8a: Aurélien Boisson -Dernier, Institutul de Biologie Vegetală , Universitatea din Zurich , Elveția. 21.15b: Eric Isselée/Shutterstock. 21.21b: dra_schwartz/iStockphoto. 21.21c: Institutul Național al Cancerului . 21.22a: Clustere ierarhice pentru un microarray. G. Sherlock și colab. (2001) Baza de date Stanford Microarray . *Nucleic Acids Research* , 29(1): 152-155, fig. 2. 21.22b: Reproducut cu permisiunea Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N, Young MW. Reglarea circadiană a sistemelor de expresie genică în capul *Drosophila* . *Neuron.* 20 de noviembre de 2001; 32(4):657- 71. Copyright de Elsevier Science Ltd. Imagen cortesía de Adam Claridge-Chang/The Rockefeller University. 21.23a: Tammy616/ iStockphoto. 21.25: Institutul Elvețian de Bioinformatică.

Capitolul 22 Aplicații și etichete ale ingineriei genetice și biotehnologiei

Fotografie de deschidere a capitolului: GFPgroup, The Roslin Institute . 22.1a: SIU BioMed/Custom Medical Stock Photo. 22.3: John Doebley/Universitatea din Wisconsin. 22.5a: Michael A. Palladino. 22.5b: C. Boerboom, Universitatea de Stat din Dakota de Nord . 22.7a: Peter Beyer, Universitatea din Freiburg, Germania. 22.8a: Universitatea din California , colecția Irvine Transgenic Mouse Facility. 22.8b: RL Brinsler/Peter Arnold/Photolibrary.com. 22.9: Choy Hew, Universitatea Națională din Singapore și Garth Fletcher, Universitatea Memorial din Newfoundland , St. John's, Newfoundland. 22.11: GloFish* (www.glofish.com). 22.12c: *Crearea* unei celule bacteriene controlate de un genom sintetizat chimic . DG Gibson și colab. Publicat inițial în Science *Express* . 20 mai 2010 , doi: 10.1126/.science.l 190719 *Science 2* iulie 2010: vol. 329 n.° 5987 52-56. 22.12c: Crearea unei celule bacteriene controlate de un genom sintetizat chimic . D. G. Gibson și colab. Publicat inițial în *Science* Express el 20 de mai de 2010, doi: 10.1126/.science.l 190719 *Science 2* iulie 2010: vol. 329 nr. 5987 52-56. 22.16ad: de Diagnostic genetic preimplantațional pentru alfa - talasemie: experiență în Spitalul Siriraj. J. Prechapanich și colab. Jurnalul *Medical Siriraj* . Volumul 60, nr. 6, 2008. 22.18: Affymetrix. 22.20ab: de Evaluarea performanței unui

cip microarray de secvențiere p53 utilizând 140 de probe de tumori ale vezicii urinare secvențiate anterior. Fredrik P. Wikman și colab. *Chemistry Clinical* - 46:10,2000. 22.21c: Institutul Național al Cancerului. 22.22a : Ash Alizadeh, *Revista Nature:* 403, pag. 503-511, fig. 4. © 2000 Macmillan Magazines Limited. 22.24: Aplicarea micromatricilor de înaltă densitate pentru expresie și analiza genotipului în bolile infecțioase. MC Lorence. *Laboratorul American de Biotehnologie,* pag. 10-12, ianuarie 2006. 22.27a: Van De Silva.

Capitolul 23 Genetică cantitativă și trăsături multifactoriale

Fotografie de deschidere a capitolului: Ed Reschke/Peter Arnold/Photolibrary.com. 23.9ab: din fw2.2: Un locus cheie al trăsăturilor cantitative pentru evoluția dimensiunii fructelor de tomate. Frary și colab. *Science,* 7 iulie 2000: 85-88. DOI10.1126/science.289.5476.85. Prin amabilitatea lui Steven D. Tanksley. Imagini nenumerotate: 23.NN02: Natures Images/Photo Researchers.

Capitolul 24 Genetică comportamentală

Fotografie de deschidere a capitolului: Eve. G. Stringham și E. Peter M. Candido, *Journal of Experimental Zoology* 266: 227-233 (1993). Publicație Wiley-Liss Inc. Universitatea din British Columbia . 24.1: Jonathan Flint. 24.8: Bazele celulare ale plasticității comportamentale: stabilirea și modificarea circuitelor sinaptice în sistemul genetic *al Dros* sophila . J. Rohrbough, DK O'Dowd, RA Baines și K. Broadie. *J Neurobiol.* Ianuarie 2003; 54(1):254-71.

Capitolul 25 Genetica populațiilor și genetica evolutivă

Fotografie de deschidere a capitolului: Edward S. Ross. 25.7: Mi chel Samson, Frederick Libert și colab., Rezistență la infecția cu HIV-1 la indivizii caucazieni care poartă alele mutante ale genei receptorului chemokinei CCR-5. Retipărit cu permisiunea *Nature* (vol. 382, 22 august 1996, p. 725, fig. 3]. Copyright 1996 Macmillan Magazines Limited . albinism de tip 2 în populația Navajo, *American* Journal Human Genetics 72 : 62-72 , fig 2 , p . Populația Navajo, *American Journal Human Genetics 72:* 62-72, fig 2, pp. 66. Publicat de University of Chicago Press. 25.18: Carl C. Hansen și Nancy Knowlton, Smithsonian Institution Photo Services. 25.20 : fig . 391-407, Kazuhiko Takahasi/Norihiro Okada , Societatea pentru Biologie Moleculară și Evoluție.

Capitolul 26 Genetica conservării

Fotografie de deschidere a capitolului: Scott Bauer, Serviciul de Cercetare Agricolă USDA/ARSZ. 26.2: John Mitchell/Photo Researchers. 26.3: Thomas Pickard/iStockphoto. 26.4a: Ingvars Birznieks/Shutterstock. 26.4b: Louie Schoeman/Shutterstock. 26.5: Sarah Ward/ Departamentul de Servicii pentru Sol și Culturi/Universitatea de Stat din Colorado. 26.6: Alison Wilson/iStockphoto. 26.9: Art Wolfe/Stone Allstock/Getty Images. 26.9: Photo West/Shutterstock. 26.10: William Leaman/Alamy. 26.13: Biblioteca de Imagini NCTC/ Serviciul pentru Pescuit și Faună Sălbatică din SUA . 26.14: Larry Richardson, Serviciul pentru Pescuit și Faună Sălbatică din SUA .

CREDITE TEXT

Capitolul 5 Cartografierea cromozomilor la eucariote

p. 144 Retipărit cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* „De ce nu a descoperit Gregor Mendel legătura?" de Stig Blixt, *Nature* vol. 256, p. 206. Drepturi de autor © 1975. www.nature.com

Capitolul 6 Analiza și cartografierea genetică la bacterii și bacteriofagi

p. 186, problema 30 I. awley, T. D. și colab. 2002. Analiza funcțională și mutațională a regiunii de transfer conjugativ 1 (Trai) din plasmida IncHII R27, *Journal of Bacteriology* 184:2173-2180, FIG. 1 și tabelul 3. Copyright © 2002 American Society for Microbiology.

Capitolul 7 Determinarea sexului și cromozomii sexuali

Fig. 7.11 Lawley, TD și colab. 2002. Analiza funcțională și mutațională a regiunii de transfer conjugativ 1 (Trai) din plasmida IncHII R27, *Journal of Bacteriology* 184: 2173-2180, fig. 1 și tabelul 3. Drepturi de autor © 2002 American Society for Microbiology.

Capitolul 9 Herencia extranuclear

Fig 9.06b E. Passarge, *Atlasul de culoare al geneticii,* 3. ° ed., Thieme Medical Publishing, 2006. Retipărit cu permisiune. Fig. 9.07b E. Pas sarge, *Atlasul color de genetică,* Ediția a 3-a , Thieme Medical Publishing, 2006. Retipărit cu permisiune.

Capitolul 10 Structura și analiza ADN-ului

p. 279 Retipărit cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* „Structura moleculară a acizilor nucleici: o structură pentru acidul nucleic dezoxiribozic " de FH C. Crick și J. D. Watson, *Nature,* vol. 171, nr. 4356, pp. 737-38. Drepturi de autor 1953. www.nature.com

Capitolul 11 Replicarea și recombinarea ADN-ului

Fig. 11.05ab J. H. Taylor, *Genetică moleculară,* Pt. 1, pp. 74-75, 1963. Drepturi de autor © 1963 și ediția revizuită din 1991, Elsevier. Utilizat cu permisiune. Fig. 1 1.06.01 Retipărire a *volumului Cell,* volumul 25, numărul 3.0. Sundin și A. Varshavsky, „Oprirea segregării duce la acumularea de dimeri catenați puternic împletiți : Disecția etapelor finale ale replicării ADN-ului SV40", p. 659-6. Drepturi de autor 1981, cu permisiunea Elsevier. www.sciencedirecLcom/science/journal/00928674.

Capitolul 17 Reglarea expresiei genelor la eucariote

Fig. 17.14 Reprodus din *Cell,* vol. 103, D. L Black, „Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology", pp. 367-370, figura 1, p. 368. Drepturi de autor 2000, cu permisiunea Elsevier. http://www.sciencedirect.com/science/journal/00928674

Capitolul 18 Genetica dezvoltării

Pagina 520 Reprodus din *Cell,* vol. 103, DL Black, „Diversitatea proteinelor din splicing alternativ: o provocare pentru bioinformatică și biologia post-genomică", pp. 367-370, figura 1, p. 368. Drepturi de autor 2000, cu permisiunea http://www.sciencedirect.com/science/journal/00928674

Capitolul 19 Cancerul și reglarea ciclului celular

Figura 19.02 Reprodusă din *Trends in Genetics,* vol. 9, Vogelstein, B. și Kinzler, K. W., „Natura multi-etapă a cancerului", pp. 138-141, figura 1. Drepturi de autor 1993, cu permisiunea Elsevier. http://www.sciencedirect.com/science/journal/O1689525 Problema 27 Din Y. Miki și colab., „Un candidat puternic pentru gena de susceptibilitate la cancerul de sân și ovarian BRCA1 (Tabelul 2)", *Science 266:* 66-71 (1994). Retipărită cu permisiunea AAAS și a autorului, www.sciencemag.org/content/266/5182/66.abstract

Capitole speciale despre genetica modernă

Genetică criminalistică

Fig. CE1.02 Butler, J. M., din baza de date STR ADN pe internet la http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/fbicore.htm . Utilizată cu permisiune . Fig. CE1.03 Butler, J. M., din baza de date STR ADN pe internet la http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/kits/Identifiler.htm . Utilizată cu permisiune. Fig. CE1.05 Drepturi de autor © 2011 Life Technologies Corporation. Utilizată cu permisiune (www.lifetechnologies.com).

Genomică și medicină personalizată

Fig CE 2.01 Fuente: Cazul pentru medicina personalizată, figură 1 , pag. 5. Drepturi de autor © mai 2009, Personalized Medicine Coa lition. Utilizado con permiso. Tabla CE 2.2 Mancinelli, L. et al., 2000. Pharmacogenomics: The Promise of Personalized Medici ne. *AAPS PharmSci* 2(1): articol 4, tabla 1. Utilizado con permi so. Fig CE 2.03 Adaptat con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Drug Discovery,* «Pharmacogenomics: Bench to Bedside», de R. Weinshilboum și L. Wang. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 739-748, fig. 3a. Copyright 2004, www.nature.com/ nrd. Fig CE 2.05 Sursa: www.PharmGKB.org . Folosit cu permisiune . Fig CE 2.06 GeneTests: Medical Genetics Information Resource (bază de date în linie). Materiale educaționale: Teste genetice: Directorul de creștere a laboratorului din baza de date GeneTests (2009). Drepturi de autor Universitatea din Washington, Seattle. 1993-2011. Dispo- nibe la http://www.genetests.org . Acces 3/2/11. Fig CE 2.07 De «True Direct DNA Measurement», fig. 2 de Hélicos BioSciences (www.helicosbio.com). © Copyright 2010. Hélicos BioSciences Corporation. Toate drepturile rezervate. Utilizat cu miso de Helicos BioSciences Corporation.

Celule stem

Fig CE 4.01 Retipărit cu permisiunea publicației *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine* (2002), p. 8, tabelul 1, Academia Națională de Științe, prin amabilitatea National Academies Press, Washington, DC Fig CE 4.02 Retipărit cu permisiunea publicației *Understanding Stem Cells* (p. 3), Academia Națională de Științe, prin amabilitatea National Academies Press, Washington, DC Fig CE 4.05 Adaptat după fig . 7, p. 11 din Hogan, Kelly A; Palladino, Michael A., *Stem Cells and Cloning, ediția a 2-a.* © 2009. Reprodus pe hârtie și electronic cu permisiunea Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey. Fig CE 4.06 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* «Nuclear reprogramming to a pluripotence state by three approaches», S. Yamanaka și H. M. Blau. *Nature,* 465: 704-712, fig. 1 și 4. Copyright 2010, ww5v.nature.com . Fig CE 4.07.2 R. H. Brown, Jr., *Science* (2008): Neuron Research Le after Ahead. Vol. 321 Nr. 5893 pagini. 1169-1170. Retipărit cu permisiunea AAAS . www.sciencemag.org/content/321/5893/1169 . rezumat. Fig CE 4.08 Adaptat după Thieman, William J.; Palladino , Michael A., *Introducere în biotehnologie,* 2.', © 2009. Reprodus pe hârtie și electronic cu permisiunea Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey. Fig CE 4.10 Reprodus din *Cell,* vol. 132, tema 1, «Molecular Medicine Select» pag. 5, Copyright 2008, cu permisiunea Elsevier , www.sciencedirect.com/science/journal/00928674 . Fig CE 4.11 Thieman, William J .; Palladino, Michael A., *Introducere în biotehnologie,* ediția a 2-a · © 2009 Reprodus pe hârtie și electronic cu permisiunea Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.

Capitolul 20 Tehnologia ADN-ului recombinant

Fig. 20.16 Thieman, William J.; Palladino, Michael A., *Introducere în biotehnologie* , 2. ª , © 2009 Reprodus în format tipărit și electronic cu permisiunea Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey. Fig 20.18 454 Secvențiere © Roche Diagnostics Fig 20.19 Adaptat după „Secvențierea genomului personal: abordări și provocări actuale " de Michael Snyder, Jiang Du și Mark Gerstein, *Genes & Development* 24:423–431, fig. 1, p. 424. ©2010, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Utilizat cu permisiunea Cold Spring Harbor Laboratory Press și a autorului.

Capitolul 21 Genomică, bioinformatică și proteomică

Apertura capitolului Búsqueda BLAST în baza de date Gen Bank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST . Fig 21.04 Búsqueda BLAST în baza de date GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih . gov/BLAST. Fig 21.08b Adaptado con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* «Analiza secvenței genomului plantei cu flori *Arabidopsis Thaliana», Nature* 408: 796-815. Drepturi de autor 2000, www.nature.com . Fig 21.10 Adaptat con permiso

de Macmillan Publishers LtduVature *Reviews Genetics,* «Tehnologii emergente în genomica drojdiei», A. Kumar și M. Snyder. *Natu re Reviews Genetics* 2(4): 302-312, fig. 3. Copyright 2001, www. nature.com/nrg. Fig 21.13 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* „Secvențierea genomului nuclear al mamutului lânos dispărut". Miller și colab. *Nature,* 456: 387-390, fig. 2, pag. 388. Drepturi de autor 2008, www.nature.com . Fig 21.14 Adaptat cu permisiunea MacmillanPublishers Ltd: *Nature,* „Genomul uman la zece ani: Explozia secvențelor", *Nature,* 464, aprilie 2010, pag. 671. Drepturi de autor 2010, www.nature.com . Fig 21.19 Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, și colab. (2007) Expediția globală de eșantionare oceanică Sorcerer II: Extinderea universului familiilor de proteine. *PLoS Biol* 5(3): 432-466, fig 1 pag. 436. Utilizado con permiso. Fig 21.20 Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ și colab. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol* 5(3): 432-466, fig 1, pag. 436. Utilizado con permiso. Fig. 21.22a G. Sherlock și colab., „The Stanford Microarray Database", *Nucleic Acids Research,* 2001, 29 (1): 152-155, fig. 2. Utilizado con permiso de Oxford University Press. Fig 21.23b M. P. Samanata et al., «Transciptomul embrionului de arici de mare». *Science* 314: 960-962, fig. 2, pag. 961, (2006). Reimpreso con per miso de AAAS. www.sciencemag.org/content/314/5801/960.abs-tract . Fig 21.28 JM Asara și colab. (2007). Secvențe de proteine de la *Mastodon* și *Tyrannosaurus rex* dezvăluite prin spectrometrie de masă. *Science* 316: 280-285, fig. 3, pag. 283. Reimpreso con permiso de AAAS. www.sciencemag.org/content/316/5822/280.abstract . Fig 21.29 Adaptado con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Mole cular Systems Biology,* «Clasificarea bolilor umane în era postgenomică: o abordare complexă de sisteme a patobiologiei umane», de Loscalzo, J., Kohane, I. y Barabasi, AL. *Biologia sistemelor moleculare* 3: 124, pag. 32-42, 2007. Figura 4, pag. 39. Copyright 2007, wwAv.nature.com/msb .

Capitolul 22 Aplicații și etica ingineriei genetice și a biotehnologiei

Fig 22.02 Reimpreso cu permis de The Biodesign Institute, Arizona State University, Box 5001, Tempe, AZ 85287-5001. Fig 22.04a Adaptado con permiso de Macmillan Publishers Ltd: *Na ture Biotechnology,* «Agbio keeps on growing», de S. Lawrence. *Biotehnologia naturii* , 23 (3), pag. 281. Copyright 2005, www.nature . com/nbt. Fig 22.04b Adaptado con permiso de Macmillan Pu blishers Ltd: 2 de marzo de 2011, *Nature* 471, 10-11, Copyright 2011, www.nature.com . Fig. 22.07b Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: 2 martie 2011, *Nature* 471, 10-11, Copyright 2011, www.nature.com . Fig. 22.10 Adaptat cu miso de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Biotechnology,* «Mastită Tac kling la vacile de lapte» de P. Rainard. *Nature Biotechnology* 23(4): 430-432. Copyright 2005, www.nature.com/nbt . Fig. 22.12a Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature Bio technology,* «Un transplant de ADN sintetic», de M. Itaya. *Nature Bio technology,* 28(7):687-689, Panoul A din figura 1, pagina 688. Copyright 2010, www.nalure.com/nbt . Fig 22.12b Gibson, DG și colab. Crearea unei celule bacteriene controlate de un genom sintetizat chimic. *Science* 329: 52-56, Panoul B din figura 1, pag. 53. (2010) Reimprimat cu permisiunea AAAS. www.sciencemag.org/content/329/5987/52.abstract . Fig 22.25 Adaptat cu - permis de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Genetics,* «Doisprezece loci de susceptibilitate la diabet de tip 2 identificați prin analiză de asociere la scară largă » de Voight și colab. *Nature Genetics,* vol. 42 (7) pag. 579-89. Copyright 2010, www.nature.com/ng . pag. 730 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: Nature, „Studiul de asociere a genomului în alopecia areata implică atât imunitatea înnăscută, cât și cea adaptivă", de Petukhova și colab. *Nature* 466:113-117, pag. 113, figura 1. Copyright 2010, www.nature.com .

Capitolul 23 Genetică cantitativă și trăsături multifactoriale

Fig. 23.08 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Genetics, „Loci cantitative ale trăsăturilor la *Drosophila",* după Mackay, T. *Nature Reviews Genetics* 2: 11-20, Fig. 3, p. 13. Drepturi de autor 2001, www.nature.com/nrg . Tabelul 23.5. Utilizat cu permisiunea *Annual Reviews of Genetics,* din „Mapping Polygenes" de SD Tanksley, *Annual Review of Genetics,* Vol. 27: 205-233, Tabelul 1, decembrie 1993. Cu permisiunea Copyright Clearance Center, Inc.

Capitolul 24 Genetică comportamentală

Fig. 24.02 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *European Journal of Human Genetics,* «Baza genetică a comportamentului emoțional la șoareci», de SAG Willis-Owen și J. Flint. *European Journal of Human Genetics* 14: 721-728, diagrama 1, p. 723. Drepturi de autor 2006, www.nature.com/ejhg . Tabelul 24.2 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Genetics , «Drosophila: Genetics»* „ Meets Behavior" de MB Sokolowski. *Nature Reviews Genetics* 2: 879-890, tabelul 1, p. 882. Copyright 2001, www.nature.com/nrg . Fig 24.10 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *European Journal of Human Genetics,* «Studii genetice moleculare ale schizofreniei» de B. Riley și K. S. Kendler. *European Journal of Human Genetics,* 14: 669-680 , fig. 1, p. 670. Copyright 2006, www.nature.com/ejhg . Fig 24.11 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: Conform «Variantele comune de pe cromozomul 6p22.1 sunt asociate cu schizofrenia», de J. Shi și colab. *Nature* 460: 753-757, fig. 1, p. 756. Copyright 2009, www.nature.com . Tabelul 24.3 De Cres pi, B. și colab., 2010, «Genomică comparativă a autismului și schizofreniei». *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107:1736-1741, tabelul 1, p. 1737. Utilizat cu permisiune.

Capitolul 25 Genetica populațiilor și genetica evolutivă

Fig. 25.02 Adaptat cu permisiunea Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* „Polimorfismul nucleotid la locusul alcool dehidrogenazei din Drosophila *melanogaster",* de M. Kreitman. *In ture* 304(4):412-417, tabelul 1, p. 413. Drepturi de autor 1983, www.nature.com. Fig. 25.03 Reprodus din *Trends in Genetics,* vol. 8, Numărul 11, L. Tsui, „Spectrul mutațiilor fibrozei chistice" pp. 392-398, fig. 1. Drepturi de autor 1992, cu permisiunea Elsevier. www.sciencedirect.com/science/journal/01689525 . Tabelul 25.4

Din *Procesele Evoluției Organice*, ediția a 3-a , G. Ledyard Stebbins, © 1977, p. 143. Reprodus cu permisiunea Pearson Education , Inc. Tabelul 25.5, Fig. 25.22 WM Fitch și E. Margoliash, „Construcția arborilor filogenetici" *Science* 155: 279-284, 20 ianuarie 1967. Retipărit cu permisiunea AAAS. www.science-mag.org/content/155/3760/279.extract . Fig. 25.22 WM Fitch și E. iMargoliash, „Construcția arborilor filogenetici" *Science* 155: 279-284, fig. 2, 20 ianuarie 1967. Retipărit cu permisiunea AAAS. www.sciencemag.org/content/155/3760/279.extract . Fig. 25.23 W. M. Fitch și colab., 1991. „Evoluție darwiniană pozitivă în virusurile gripale A umane", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 4270–4273, fig. 1. Utilizată cu permisiune. Fig. 25.24a Reprodus din *Cell,* vol. 90, Numărul 1, Krings, M. și colab., „Secvențe de ADN neanderthal și originea oamenilor moderni", p. 19-30, figura 7A, p. 26. Drepturi de autor 1997, cu permisiunea Elsevier, www.sciencedirect.com/science/journal/00928674 . Fig. 25.24b Adaptat cu permisiune de la Macmillan Publishers Ltd: *Nature,* «Analiza moleculară a ADN-ului neanderthal din Caucazul de Nord», IV Ovchin nikov și colab. *Nature* 404: 490-493. Drepturi de autor 2000, www.nature.com . Figura 25.25 Noonan , J. P. și colab. 6, p. 1117. Retipărit cu permisiunea AAAS. www.sciencemag.org/content/314/5802/1 11 3.abstract. Fig. o problemă suplimentară *te începă 36 Reprodus din D. Caramelli și colab. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6593–6597, fig. 2, p. 6596. Drepturi de autor 2003 Academia Națională de Științe, SUA. Utilizat cu permisiune.

indice analitic

2-aminopurină (2-AP), 419 2-deoxiriboză, 271
3-5', direcția, 307
45, sindromul X , 194-195
Cariotip 45,X/46.XX, 195 Cariotip 45,X/46,XY, 195
47. Sindromul XXX, 196
47. Sindromul XXY, 194-195
47. Condiția XYY, 196
48. Cariotip XXXX , 196
48. Cariotip XXXY, 195
48. Cariotip XXYY, 195
49, Cariotip XXXX, 196
49. Cariotip XXXXY, 195
49. Cariotip XXXYY, 195 5-azacitidină, 475 5-bromouracil (5-BU), 419 5-metilcitozină, 334, 474
5'-3', direcție, 301 7-metilguanozină (7-mG), cap, 366, 388 9meri și 13meri, 304

LA

A și B , 82
Bombay, fenotip, 82,88
și albinism la oameni, 87 Aberații cromozomiale, 2 1 5. *Vezi și* mutații cromozomiale ABO , grupe sanguine la oameni, 81-82,87
în populația nativă americană . 791-793
Avorturi (spontane) la oameni
Concepție, 220 Clemă glisantă, 306
Absorbția luminii ultraviolete (UV) , 283, 284
Cromatide acentrice, 230, 231 Fond genetic, 777
Mutația creează noi alele în. 790 Acetilare, 333, 573 Acid aminoacil-adenilic, 383 Acid dezoxiribonucleic. *Vezi* ADN. Acid homogentisic, 389 Acid nucleic
Structura ADN-ului , articol de Watson și Crick în *Nature,* 279-280
Structura chimică, 271-274 Acid ribonucleic . *Vezi* Acondroplazie ARN, 423, 439, 790
Creștere populațională, 822-823 Acrocentric, cromozomi, 24 Actină, 23, 402
activator (Ac)-disociator (Ds), la porumb, 434
Activatori, 480
interacțiunea factorilor generali de transcripție la nivelul promotorului, 480-481
situs activ, 402
și represori transcripționali, 364 Activitate genetică variabilă , ipoteza, 499
Adaptiv, mutație, 412-413
Adaptiv, enzimă, 444
ADAR (adenozin deaminază care acționează asupra ARN-ului), enzime, 370
Adelberg, Edward, 164
Adenil ciclază, 451
Adenină (A), 7, 271,275
Adenină-timină, perechi de baze , 278
Adenin metilază, 425
Adenozin deaminaza (ADA), 720
Adenozin trifosfat (ATP), 23, 273, 452
Adenovirus, 721
ADN, 1,6
ADNcp (ADN cloroplastic), 242-244, 246-248
ADNmt (ADN mitocondrial), 245-252, 255-256
ADNr, 227
Foarte repetitiv, 336 bandă principală. 337
cipuri , 13 clonare, 9
de uniune, 330
duplicare și recombinare, 295-322 în celule haploide și diploide ale diferitelor specii, 269
distanțier, 380
structură, 7.271-280
Fluxul de informații dintre ADN și proteine, ARN ca moleculă intermediară, 359
forme alternative, 280-282
girasa, 304, 316
glicozilaze, 427 helicază, 137 ligază, 306, 308, 316, 603 moderat sau moderat repetitiv, 339
molecule heteroduplex , 314 organizarea cromozomilor , 323-345 brevete, 727
purtător de informații genetice, primele 7 studii despre, 262 dovezi care susțin că ADN-ul este materialul genetic, 262-269
rearanjări programate la eucariote , 470
superînrăsucit, 324,326 tehnici analitice utilizate în studiul, 283-289
secvențe teiomerice, 338 topoizomeraze, 304
ADN, baze de date cu profiluri , 553
Cazul Kennedy Brewer , 554
Carcasă Pitchfork, 545
probleme tehnice și etice , 554-555
amprentare genetică bazată pe VNTR, 545-546 identificarea victimelor atacurilor de la World Trade Center , 551
profilurilor ADN , 552-554
eroarea procurorului , 553
mitocondrial, 549-550 profil STR al cromozomului Y , 548-549 profiluri de polimorfism cu un singur nucleotid, 550-552
unicitatea profilurilor ADN , 553
ADN, biblioteci genetice , trasarea bibliotecilor genetice 609-612 , 61 1
ADN, markeri ai, 134 cartografierea cromozomilor folosind, 135-136
ADN mitocondrial (ADNmt), misterul Romanovilor , 255-256 , excepții de la universalitatea codului genetic , 357-358, mutații care cauzează boli umane, 250-252, 256 , mutații, studii la *Neurospora* și drojdie, 244-246, organizare moleculară și produse genetice , 248-249 , profilul, 549-550, dimensiunea la diferite organisme, 248, tulburare la gemenii identici , 256
ADN, polimerază I, 301, 305, 308
ADN, polimerază II, 303
ADN polimeraza II!, 303, 305, 425 sinteza în direcția 5' -3' , 305 subunități ale holoenzimei , 303
ADN, polimeraza IV și V, 303
ADN, polimeraze, activitate exonucleazică 3'-5', 307 eucariote, 308, 309-310, 316 gene de E. *coli* care specifică subunități în replicare , 308
ADN, recombinare, 314-317
conversia genetică ca o consecință a, 316
ADN, recombinant, tehnologie, 1,9, 19,270, 601-633
Cartografierea restricțiilor și primerii PCR . 627-629
enzime de restricție și vectori de clonare a ADN-ului , 602-608
studii, 270 biblioteci de ADN , colecții de secvențe clonate, 609-612 probleme potențiale, 629 producția de vaccinuri și plante transgenice cu vaccinuri comestibile, 692-694
reacția în lanț a polimerazei (PCR), 613-617
Secvențierea ADN-ului , 621-626; tehnici moleculare pentru analiza ADN-ului , 617-621
ADN, repararea , 425-431 catenă dublă la eucariote , 429-431

defecte în celulele canceroase, 525-526
detectarea erorilor și repararea nepotrivirilor, 425-426 prin excizia bazelor și nucleotidelor, 427-428
Excizia nucleotidelor și bolile speciei umane , 428-429
prin fotoreactivare, inversarea deteriorării UV , 426-427
Sistem post-replicativ și SOS, 426
ADN repetitiv, 287-288, 336-340 categorii, 337 în eucariote, 660 puncte fierbinți în mutațiile
ADN-ului , 416
satelit, 336-337
secvențe centromerice, 338 secvențe moderat repetitive, VNTR-uri și STR-uri, 339
secvențe transpozabile, SINE și LINE, 339-340
telomeric, 338
ADN, secvențierea , 621-626 progrese în tehnologiile de, 624,625 computerizat de mare randament - automatizat , 623,638 metoda Sanger, 621-622 prin didcoxinucleotide, 621 prin fragmente alese aleatoriu din întregul genom (clonare cu fragmente alese aleatoriu) , 636-641 tehnologii de secvențiere de următoare generație, 624, 625 și genomică, 626
ADN, sinteză, 295
concomitent în lanțurile principal și final, 306-307
inițiere continuă și discontinuă, 305-306
folosind primer ARN, 305 neprogramată , 428
ADN, vectori de clonare, 602, 603-608 celule gazdă pentru, 608 cromozomi artificiali bacterieni, 607 fagi, 605 plasmide, 604-607 vectori de expresie , 607 vectori Ti pentru celule vegetale, cromozomi artificiali de drojdie, 607
ADN-A, 280 gene abdominale A și abdominale B, la *Drosophila,* 506
ADN-B, 291
ADN-C, 280
ADN-D, 280
ADN -E , 280 ADN-P, 280 ADN-Z, 281, 291
ADNr, 227, 380 Aflatoxină, 538
Gel de agaroză . 288,617,620
Agent filtrabil, 172
Agenți care formează aducti , 420 Agenți de intercalare, 420
Agricultură moleculară. 689
Alungirea alternativă a telomerilor (ALT), 317
Albinism, 67,86
oculocutanată (OCA), 791-793
Alcaptonurie, 389
Alcool dehidrogenaza *(Adh),* genă la *Drosophila,* 778
Alelă aditivă , 736
bazele variației continue , 737
Alela letală dominantă , 85
Alelă letală recesivă, 84
mutație a culorii blănii la șoareci , 84 , 85
Alelă nulă , 78
Alele, 49
Aditivi și neaditivi . 736
modificarea fenotipurilor, 78-79 calcularea frecvenței alelelor într-o populație, 782-784, 785
Calculul frecvenței alelelor multiple în populație, 784-785
Calculul frecvenței pentru caracterele legate de X , 785-786
Finanțare în cocomponente, 81
definiție, 6, 25
dominanță incompletă sau parțială, frecvența alelelor 80 într-o populație, 780-782
ipostatic, 88
Migrația și fluxul genetic modifică frecvențele alelelor , 791
selecția naturală modifică frecvența alelelor , 786-789
multiple, 81-84
Mutația creează noi alele în cadrul unui fond genetic, 790
simboluri, 79
Alfa (a)
ADN polimerază, 310
lanțuri a, 395
elice a, 398
ADN polimerază 111 subunitatea a , holoenzimă, 303
α-globină, genă, 664
al-antitripsină, proteină, 692
Bumbac, *Gossypium,* 223
Algoritmi de grupare , 670 Alicotă, 170
Aliniere, 636
ALK (kinaza limfomului anaplazic), 558
ALK/EML4, genă de fuziune , 558
Alloway, J. Lionel, 264 Stocarea informațiilor, 261 Alopoliploidie, 221, 222-224
Alosteric, 447
Alotetraploid, 223
Proprietari, agenți, 420
Aluminiu, element, 436
Alu, familie, 339
Inundație genetică, 823
Boala Alzheimer , 401
Mediu și epigenetică, 581-582
Testul Ames , 431-432
Amine heterocide (HCA), 420
Amino, grup, 396
conversia la gruparea ceto în dezaminare, 417
Aminoacizi, 398
analiza hemoglobinei în studiile privind anemia falciformă, 395 atribuiri la trinucleotide specifice derivate din testul de legare a tripleților, 353,354
încărcați negativ, 396, 397 încărcați pozitiv, 396-397 dicționar de coduri, 355-357 modificări ale histonei, 573 nepolari (hidrofobi), 396, 397 polari (hidrofili), 396, 397 similari chimic, având în comun baza intermediară în codoni tripleți, 356
Rezultate și interpretarea experimentului cu copolimer mixt, 352 Douăzeci de aminoacizi codificați de organisme vii, 398 Aminoacil ARNt sintetaze, 249, 382 Amniocenteză, 219, 704 Test AmpliChip CYP450, 562 Amplicon, 199 Amplificarea genelor, 227 Amtzen, CJ, 181
Anabolism, 402 Anaerob facultativ, 244
Anafază în mitoză, 26,27, 28,29 Anafază I, meioză, 34,36 Anafază II, meioză, 35,36
Analiza Bald, 170 Analiza ADN-ului prin difracție de raze X, 275 ARN în ribozomi în timpul translației , 388
Cristale de nucleozomi , 333 Analiza hibridizării Northern , 618,620 Analiza Chi-pătrat, 62-66,70
a încrucișărilor dihibride și monohibride , 63 interpretarea valorilor probabilității . 64-65 și ipoteza nulă, 63-64
Analiza microarray ADN , 287, 562, 669
Analiza tetradelor dezordonate , 141 Analiza transcriptomului, 668-672 Analiza statistică a caracterelor
poligenic, 738-741 aplicarea conceptelor de , 740-741 covarianță, 740 deviație standard, 739 distribuție normală, 739 eroare standard a mediei, 740 medie, 739-740 varianță, 739
Analiza criminalistică aplicată faunei și florei , 551.812
Analiza globală a expresiei genelor , 668-672
Analiza comportamentală , tehnică, 759-766
Analiza genelor, 762-766 Baza de date HomoloGene, 771 Maparea genelor legate de anxietate la șoareci, 759 Componente genetice ale comportamentului uman, 766-771

Comportament, definiție, 758 Epigenetică, 581
Selecția geotaxiei la *Drosophila,* 760-762
Analiza genelor în genetica comportamentală , 762-766 Învățare și memorie la *Drosophila,* 764
Gene implicate în traducerea impulsurilor nervoase , 763-764 Mecanisme și căi neuronale ale învățării, 764-766 2-aminopurină (2-AP), 419 5-bromouracil (5-BU), 419
Analogi de bază , 4 19
Anemia falciformă, 9, 393-395,401,706-707
tratament cu celule stem , 595-596 aneuploidie, 215 celule canceroase, 522 la om, 220
monosomie, 216 trisomie, 217-219
Amfibian *(Xenopus laevis),* abundență de ribozomi, 228
Un fidiploid, 223
Sindromul Angelman, 103
Angiosperme, fază sporofitică diploidă și fază gametofitică haploidă , 38
Animale
clonare, 1 monosomie în, 216 trisomie în, 217
Animale transgenice, 1 1.270.698-701 creare, 698-699 exemple, 699-701 produse farmaceutice biosintetizate , 691-692
șoarece, modelul bolii Huntington, 767
șoareci, 198
Adnotări, 641-643 caracteristici distinctive ale unei secvențe genetice, 643-645
Antennapedia, gene în *Drosophila,* 505 Anti-TRAP (AT), proteină, 458
Anticiparea genetică, 102, 235 Anticodon, 352, 379
Reguli de împerechere a bazelor anticodon-codon , 356
Anticorpi, 471
Antigene, 471
Antiparalele (lanțuri cu dublă helix), 276 , 305
Anti-terminator, 456
Antitrombină, 692
APC (polipoză adenomatoasă), genă, 536
Apirimidinic sau apurinic, situs, 427
Apolipoproteina B (apo B), 370
Apoptoză, 514
Inhibiție în celulele canceroase , 529 *Applied Biosystems* (ABI), 624 Învățare și memorie la *Drosophila,* 764-765
mecanisme și căi neuronale ale învățării, 764-766
Aptamer, 459
Operonul Ara (arabinoză) , reglarea genetică a, 460-461
Arabidopsis thaliana (muștar), 15, 248, 432
categorii funcționale pentru gene, 645-648
gene homeotice în, 509-511
Arber, Werner, 602
ARE (element bogat în adenină-uracil), 487
Arginină, 330.392
biosinteză în *Neurospora,* 392 Aristotel, 3
Arlechin, cromozomi, ARN 137
primer pentru replicarea ADN-ului, 304, 305, 309
ca material genetic al unor virusuri, 270
structură, 7,271-273,282-283 studii care dovedesc existența ARNm , 359-360
heteropolimeri de, 351 homopolimeri de, 351 mecanisme de splicing, excizia intronilor și splicingul exonilor , 368-370
sinteza ARN-ului , 360-363
transcripție inversă, 312 ribozomal, redundanță și amplificare genetică, 227-228
ribozomal și de transfer, 224 utilizat de ribocomutatoare, 459-460
sinteză în transcripție , 261, 359 tehnici analitice utilizate în studiul , 283-289
ARN interferent scurt (siARN), 283 ARN de transfer (tARN), 7.224.251, 282, 283
adaptor în sinteza proteinelor, 350 ARNt, ^{Mrt} , 388
ARNt ^{1} **, 251
baze modificate în, 381
încărcare, 382-383 încărcat, 352 codificat de ADN mitocondrial, 249 definiție, 379
eliminarea intronilor la bacterii, structură 368, 380, 384
model cu frunze de trifoi , 381
model tridimensional , 382 sinteză, 261
ARN mesager (ARNm), 7, 23,282
controlul stabilității , 487
tăiere și îmbinare alternativă, 483-485
definiție, 282
descoperirea, 348 diferențe între eucariote și procariote, 388 monocistronice, 363 policistronic, 363.446 pre-ARNm în transcripția eucariotă, 363
reglarea procesării, 468.469
ribocomutatoare, 459 sintetice, 350-351
rate de descompunere la eucariote, 470
ARN nuclear eterogen (hnARN), 363 procesare cap și coad, 366
ARN nuclear mic (snARN), 283, 369 ARN interferent mic (siARN), 488-489, 574,723
ARN polimerază II, 364, 480
ARN polimeraze, 350
Descoperiri recente privind funcțiile din procesul de transcripție, 365 eucariote, 363 care direcționează sinteza ARN-ului, 360-363 ARN replicaza, 271 ARN ribozomal (ARNr), 22,224, 227-228, 282,283
codificat de ADNmt uman , 249
la eucariote și procariote, 387 sinteză, 261
ARN telomerază, 283
ARN telomeric care conține repetiții (TERRA), 338
ARN, reducerea la tăcere a genelor indusă de, 468. 488-491
în biotehnologie și medicină, 489
mecanisme moleculare, 488-489
ARNg (ARN ghid), 370
ARNm monocistronic, 363 ARNm policistronic, 363, 446 ARNm. *Vezi* ARN mesager complex ARNm-ARNt-aa,-aa $_{n}$, 384
ARNr. *Vezi* ARN ribozomal , izoacceptori de ARNt, 383 ARNt. *Vezi* ARN de transfer aromatază , 208
Orez
aur, 11.697
cercetare genetică, 750
plantă *(Oryza salivă),* trisomie în, 217 Asea, 139
Ascospori, 139 Astbury, William, 276 Atenuare definiție, 456
reglarea operonului *trp* în *E. coli,* 456-459
Atcnuador, 456
Atlasul epigenomului uman, 582 *Atlasul de genetică și citogenetică în oncologie și hematologie,* 236
Atom central de carbon (C) , 396 ATP (adenozin trifosfat), 23.273 Atrofie retiniană progresivă (PRA), la câini, 104
Autism, 146
variații ale numărului de exemplare (CNV), 229
și schizofrenie, 770-771 Autofertilizare, 47
Autopoliploidie, 221-222 Autoradiografie, 299
Autoreînnoire, 584 Autotetraploide, 221
Autotriploide, 221 Auxotrof, 101 , 156 Avery, Oswald, 6,262,264-266 Șansă, influență asupra datelor genetice , 62-65

Zahăr pentozidic, 271
Crin tigru *(Lilium tigrinum), 222*

B.

B, antigen (grupe sanguine ABO), 83 B. *subtilis*
Proteinele TRAP și AT direcționează atenuarea în ribocomutatoare , 456-459
Bacterie
B. subtilis, atenuare în, 456-459 Compoziția ARN după infecția E. *coli* cu fagi T2 și T7 , 360
tulpini folosind genomuri sintetice și transplant genomic, 702 detectarea perechilor nepotrivite , 425 studii care susțin ADN-ul ca material genetic, 262-269
Studii care dovedesc existența ARNm , 359-360
Studii privind reglarea expresiei genelor , 443-467
Cubacleria, structura celulară și ADN-ul, 22 de intoxicații alimentare și expresia genelor bacteriene, 461 *leu~* și *leu*,* 80 mutație spontană și rată de creștere exponențială, 155-157 mutații nutriționale, 101 organizarea ADN-ului în cromozomi, 324-326
parțial diploid, 449 plasmide ca vectori pentru clonarea ADN-ului , 604-607 producția de insulină, 690-691 recombinare genetică în, 155-165 replicare semiconservativă a ADN-ului , 296-299 rezistent la antibiotice, 182 simț al colectivității, 462 sinteza ADN-ului în, 301-304 rată de mutație spontană, 41 1 , 412 test Ames pentru mutagenitate , 431 transpozoni (elemente Tn), 434 utilizarea clonării, 9-10 virulent, 262
Bacteriofagi, 168-170 analiza cheliei, 170 ca vector de clonare , 607 confirmarea codului genetic în studiile fagului MS2, 357 definiție, 6 fag T-4, structură și ciclu de viață , 168 fag T2, 266-268, 325 lambda z, 324, 325 lizogenie, 170 phi X, d»X174 bacteriofag, 324, 325, 358, 635
recombinare intergenică, 174-175 rată de mutație spontană , 411,412 transfer de ADN bacterian prin intermediul unui virus , 170-174
Balbiani, E. G. 328
Banane comerciale, 222
Bănci de gene , 821
Benzi C, 335
Bandare cromozomială, 328, 335-336
Bar, mutație la *Drosophila,* 228
Amestecarea exonilor , 403-404
Barnett, Leslie, 348
Barr, corpusculi, 200-201, 334
Barr, Murray L., 200
Barski, Georges, 134
Bază azotată (nucleotide), 271
Baze, 7
modificat în ARNt, 381
ribonucleotidele ca litere ale codului genetic, 347 Baze de date, 2
de infractori condamnați, 554
criminalistică, 554
GenBank, 641
Genele umane, mutațiile și bolile, 422
genetică, 2
HomoloGene, 77 1
Profiluri ADN, 553
de farmacogenomică (PharmGKB), 564
secvențe proteice , 404
utilizare în cartografierea cromozomilor, 135-136 baze, împerechere
în ADN, 275, 276-278, 285
în ARN, 283
modificări tautomerice standard și anormale , 416
Bassler, Bonnie, 462 Bateson, William, 389, 390, 736
BAX și Be 12, proteine ale apoptozei , 529-530, 532
Bax, gen., 532
Beadle, George, 101.390
Sindromul Beckwith-Wiedemann , 576. Beet, E. A., 394.
Tumori benigne, 523
Benzer, Seymour, 176-180
Berg, Paul, 624
Berger, Susan, 366 Bertram, Ewart G., 200 Beta *(fi),* ADN polimerază, 310 //-galactozidază, 445 /f-globină, genă , 367.423.666
adnotare care conține o parte din, 644
intensificator, 477
mutațiilor punctuale asupra nivelurilor de transcripție, 476
/1-talasemie, 373.423
Tipuri de mutații ale genei HBB care cauzează, 424
Gena bicoidă *(bccT)* la *Drosophila,* 254
Biodiversitate, 809
Produse biofarmaceutice, produse, 689
disponibile sau în curs de dezvoltare, exemple, 690 Bioinformatică, 13, 19, 641-645
adnotare pentru identificarea secvențelor genetice, 641-643
Biologie
de sisteme, 680-687
modern, zorii, 3
Biologie sintetică, 703
brevete și 729
Biochimie, 402 Bioreactoare sau biofabrici, 691
Amplificări ale ADN-ului în celulele canceroase , 525
Biotehnologie, 1, 19
agricol, 694
definiție, 10
în genetică și medicină, 12-13
impact, 10
plante, animale și alimente, 10-11
proprietatea organismelor transgenice , 11-12
Silențierea genelor indusă de ARN , 489
Bioterorism, 291
Biotină, în procedurile FISH, 287 Bisexual, 189
Bithorax, gene la *Drosophila,* 506 Bivalent, 32,34
Blackburn, Elizabeth, 31 de ani, 312.318 ani
BLAST *(Instrument de căutare a alinierii locale de bază),*
290.438.491-492.642.683
Blastocist, 585
BLE (element bazal), 479
Blixt, Stig, 144
Sindromul Bloom , 137
Boiga irregularis (șarpe de copac maro), 809
Traista ciobanului, forma seminței , 90 Bombay, fenotip, 82, 83, 88 Secvențe de draft, 640-641
Boveri, Theodor, 5, 58
Brassica oleracea, încrucișare cu *Rapharnus sativa,* 223
BRE (element de recunoaștere TFIIB), 476
Brenner, Sydney, 348,349,360
Brewer, Kennedy, 554
Bridges, Calvin, 84, 97, 120, 204, 228 Britten, Roy, 287, 336
Brockdorff, Neil, 203
Bromodeoxiuridină (BrdU), 419
Bucla de compensare , 225
Bucle t, 312
Bulele de replicare, 309 Burkitt, limfom al. 523
Bush, George W., 597 Căutare omoloagă , 33

C.

C-3', capăt, 273
C-5', capăt, 273
C. *elegans,* 432
Analiza genetică a formării vulvei, 513-514
ciclul biologic , 191-192
dezvoltare, 512-513
genom, 13.649 interferențe pozitive în încrucișări, 132 moarte celulară programată în dezvoltare, 514
CAAT, cutie poștală, 477, 643
Lanț

avansat, 306
întârziat, 306
Lanțuri //, 395
Lanțuri ușoare (L), 471
gena κ ale lanțului ușor, 471-473 Lanțuri grele (H), 471 Lanțuri polinucleotidice ale ADN-ului, 334 Lanțuri polipeptidice , 399
aminoacid inițial inserat în, 356 molecule de imunoglobulină , 471 ne-genă: un lanț polipeptidic, ipoteză, 393
și structura cuaternară a proteinelor, 399
Caenorhabitis elegans. Vezi C. *elegans* CAG, repetiții trinucleotidice, 767 Cairns. John, 299, 302 Cutie homeotică, 506 Dovleac
culoare, interacțiune genetică, 91 forma fructului , 58
Calcitonină/ peptidă legată de gena calcitoninei (*gena CT/CGRP),* 483 Calva, 170
Chelie la oameni, 99
Schimba
de fază , 348 , 414
de semnificație, mutații ale, 414,423,437
tautomerice, 416-417
cAMP (adenozin monofosfat ciclic), 451-452 AMPc, metabolismul și învățarea, 765 Field, 710
Canalele receptorilor de glutamat, editarea ARN și 370
Cancer, 521-543
Agenți de mediu care cauzează, 538 agenți intercalanți utilizați în chimioterapie, 420
Aplicații ale silențierii genetice induse de ARN , 489
Proiectul de Anatomie a Genomului Cancerului (CGAP), 539
Proiectul Atlas al Genomului Cancerului (TCGA), 539 cauzat de amine heterociclice , 420 cauzat de defecte în repararea nepotrivirilor , 425 cancer colorectal neasociat cu polipoză ereditară (HNPCC), 526
defecte genetice în celulele canceroase, 525-526
Defecte genetice care afectează reglarea ciclului celular , 527-529 boli genetice la nivel celular somatic, 522 epigenetică și, 577-579 gene înrudite inactivate prin hipermetilare , 578 legate de situsuri fragile, 234-235 metastaze și invazia altor țesuturi, 534 modificări ale cromatinei și epigenetica cancerului, 526 originea clonală a celulelor canceroase, 523 predispoziție ereditară la, 535-536 proces în mai multe etape care necesită mutații multiple, 524 proto-oncogene alterate și gene supresoare tumorale , 529-534 pulmonare și CNV, 229 virusuri care cauzează, 536-538 și reglarea telomerazei, 317, 338
Cancerul de colon și dieta, 538 dezvoltarea în mai multe etape ale, 536 ereditară, 425 moștenirea predispoziției la, 535 tratamente medicamentoase, 558-560 și gena TBX22, 539
Cancer la sân , 523, 535, 538
Gena *HER-2* și tratamentul cu Herceptin 558-559, 560
Tratament cu tamoxifen, 539
Canis familiaris (câine), genom, 660-661 *Canis lupus* (lupul gri), 816
Caracter
epigenetic, 570
fix al speciei, 3
Personaje, 46 de încrucișări monohibride alternative ale
Mendel cu mazărea de grădină, 47 complexe, 735 meristice, 735 multifactoriale, 735 prag, 735
Analiza statistică a trăsăturilor poligenice. 738-741 nu toate prezintă variație continuă, 735
Carboxil, grupare, 396
Carcinogeni, 431-432, 524, 538 Carcinom pulmonar non-miocitar , 558 Sarcină genetică, 816
Cariokinezie, 26
Cariotip, 24
celulă canceroasă și normală, 522 derivate din diviziunea celulară masculină, 25 umane, benzi G. 335
Ciocănitoarea cu coroană roșie *(Picoides borealis),* 817
Carr, David H., 220
analiză crossover multiplă 114-153 pentru determinarea secvenței genelor, analiză scorare lod 122-123 și hibridizare
a celulelor somatice în hărțile cromozomiale umane, 132-135 a genelor Drosophila , 132 determinarea secvenței genelor, 125-127
încrucișări pentru a determina
distanța dintre gene, 1 18-122 studii pe organisme haploide, 141-144 Hfr, bacterii, 159-162 inexactități rezultate din creșterea
distanța dintre gene, 130-132 hartă în trei puncte la *Drosophila,* 123-125 hărți genă-centromer, 139-141 probleme de cartografiere la porumb, 127-130 transducție și, 174 utilizarea markerilor ADN și a bazelor de date adnotate, 135-136
Cartografierea restricțiilor, 617-618,627-629
Cartografierea centromerului, 139-141
Caspaze, 529
Catabolism, 402
Cataliza biologică, 402
Categorii funcționale ale genelor umane, 651, 652
Cavalli-Sforza, Luca, 159
CCR5 și susceptibilitatea la HIV-1,782-784
Proteina CD82, 535
CDK (kinaza dependentă de ciclină) , 80, 528
CDK/cidină, complexe, 528
CDK 1 /ciclină B, 528,529
CDK4/ciclină Di, complex, 532, 534 Primer, 303.613
Designul primerului PCR, 628
în replicarea ADN -ului eucariot, 308, 309
inițierea sintezei ADN-ului, 305
Cech, Thomas, 368
Daltonism roșu - verde , 97, 98, 202
Celera Genomics, 649
Celulă
Structura animală tipică, 22 structura celulară legată de funcția genetică , 21-23
interacțiunea tuturor componentelor din 680-682
nervos (neuron), 763
Celule
fetală, selecție de, 704
mutații germinale la, 413 fiice, 30
gazdă pentru vectori de clonare, 608
Celule stem , 515-516, 583-600 aplicații potențiale, 592-597 canceroase, 523, 579, 586, 587 probleme etice , 599-600 la adulți, 586 definiție, 584 din lichidul amniotic, 587
stimularea SCM-urilor pentru diferențiere, 586
populația potențială de pacienți din SUA pentru terapii cu , 584 probleme și provocări, 597
Teste pentru determinarea pluripotenței, 587 regulamente, 597-599
Celule stem embrionare umane , 585
izolare și cultivare, 585 surse de, 585
Celule stem obținute de la adulți, 586 repararea țesutului cardiac cu, 594
Celule stem pluripotente, 584
indus, 589-592
indus specific pacientului , 590, 591 indus de ARN , 592
tehnici de programare nucleară pentru a produce, 589
Celule somatice
hibridizare, 132-135.428 mutații în, 413
reprogramare nucleară a, 589-590

Celule vegetative haploide . *Chlamydomonas,* 189
Regiunea CEN, 338
Secară
hibridizarea genului *Secale* cu grâul *(Triticum),* 223-224
Secale cereale și *Efymus canadensis,* 44
Centrifugare
prin echilibru de sedimentare , 283, 297 prin gradient, 283-285
prin gradient de densitate plutitor, 283, 297
prin rata de sedimentare, 285 procese de, 283-285
Contoare
definiție, 23
în timpul mitozei , 27
Centrul de inactivare a X (Xic) , 203
Centrosom, 23, 27
Tulpină mutantă extrem de rugoasă (ER) , 266
Tulpina de șoarece *unu ,* 1 1
Porci modificați genetic, 701
Chambón, Pierre, 367
Însoțitori, 401
Charcot-Marie-Tooth, boală, 656-657 Chargaff, Erwin, 262,274,275
Date privind compoziția bazelor ADN-ului , 275.277
Chase, Martha, 266-268
Cimpanzeul *(Pan troglodytes),* genom, 661 cip genotip, 562, 710-711
Cip pe cip, 647
Chipsuri
a expresiei genelor, 712-715
genetic, 669
proteine, 677
Chironomus (țânțar), 328
poliribozomi sub microscopie electronică, 386
Chlamydomonas
ADN cloroplastic , 248
analiza tetradelor în, 141
ciclu biologic, 138, 189-192 mutații ale cloroplastelor, 243-244
Biserica, George, 655
Cicline, 30, 528
Gl, în drojdia poliploidă, 222
Ciclul celular , 26
defecte genetice care afectează reglarea în celulele canceroase, 527-529
Gena de control *CDKN2A ,* 577 ilustrare a etapelor , 26 kinaze, 309
puncte de reglare și control , 30-31
Ciclul diviziunii celulare (EDE), mutații ale, 30
Ciclul litic , 169
Cicluri (în PCR), 613-614
Cigoteno, 33 de ani
Zigot, 26.585
diploidă, *Chlamydomonas,* 189
Ciliate, protozoare. *Vezi și Tetrahymena*
Cinetica reasocierii , 287-288, 336
Kinetocor, 29, 338 Cistroni, 178.363.446
Citokineză, definiție, 26 Citoplasmă, 23
Citozină (C), 7.271.275
guanină-citozină, perechi de baze, 277
metilare, formând 5-metil) citozină, 334
Citozol, 23
Clase reciproce , 125 Cline, Tom, 207 De la clonă la clonă, tehnică, 638, 639 Clonare, 9-10, 602. *Vezi și* ADN recombinant , tehnologie de cartografiere , 638.639 animale, 11 prin fragmente selectate aleatoriu, 636-641 prin fragmente selectate aleatoriu din întregul genom, 609
pozițional, 635 terapeutic, 596 vectori ai, 603. *Vezi și* ADN , vectori de clonare
Clone, 9, 202 Cloroplaste, 23, 242
mutații la *Chlamydomonas,* 243-244
variegație la floarea de la ora patru, *Mirabilis jalapa,* 242-243 Coactivatori, 481 Sindromul Cockayne, 429 Cod triplet , 347
teste experimentale , 348-350 Cod genetic, 347
Caracteristici generale, 347 confirmare în studii ale fagului MS2,357 definiție, 7
degenerarea și ipoteza oscilației , 355-356
descifrat din 350-355
Inițierea, terminarea și suprimarea sintezei proteinelor, 356-357
natură tripletă , 348
natură degenerată și fără virgule, 349 natură nesuprapusă, 349 natură ordonată a, 356
natură universală a, 357-358 ordonată, 356
Modele de bază de funcționare, 348 Cod histonic, 574 Codominanță, 81 Codon, 7, 347
de inițiere, 356
Codoni stop , 385 Codoni de terminare , 355 , 357, 385 Excepții de la codul genetic, 357-358
Codoni fără sens, 350, 385 Coeficient(i)
de coincidență, 131
de consangvinitate, 793-794, 815, 816
de sedimentare, 379
numeric, 62 Cohesin, 27, 33
în anafaza I a meiozei, 34 Col, *Brassica oleracea,* 223
plasmidă, 166
Colagen, 402
Identificarea în fosilele de *Tyrannosaurus rex* și Mammut *americanum,* 677-680
pro-x-2(l), generație, 368
Cozile N- terminale ale histonei, 573
Colchicină, 221
Colecție de bază, 821
Holera, vaccin comestibil pentru ea, 181
Colinearitate, 357, 395
Collins, Frances, 649
Compartimente intercromozomiale, 473
Compensarea dozei
în *Drosophila,* 206-207
la mamifere, 200-204 Competiție, 167
Compilare, 640 Complex(e)
compensarea dozei (DCC), 206
de inițiere, 383, 384
- inițiere, 365, 480
de pre- replicare (pre-RC), 309
de recunoaștere a originii (ORC), 309
Silențiere indusă de ARN (RISC), 489, 574, 723
gene co-adaptate, 823
represori, analiza structurii cristaline a, 452-454
Sinaptinemic, 34 Complementare, 177, 429
analiză, 93-94, 105 grupuri de, 93.177, 363.429
prin mutații r//, 177-178 test de, 177
Complementaritate, 277 Mutații
comportamentale, 4 1 5 Comportament, genetica, 757-775 Comportament de sedimentare , 283-285 Distincția diferitelor ARN-uri, 282
Comportamentul uman, componente genetice ale, 766-771
trăsături comportamentale complexe, schizofrenie, 768-770 schizofrenie și autism, 770-771 gene izolate și comportament, boala Huntington, 766-768
hărți cromozomiale umane pe internet, 145
Compoziția bazelor ADN-ului , studii , 275-276
Concordant, 746
Condiție restrictivă, 101
Condițional, mutație, 101, 308, 415 Condiții de mediu
modificări epigenetice legate de, 581 care afectează fenotipul , 101 care cauzează cancer, 438
Reglarea expresiei genelor la procariote ca răspuns la, 444 iepuri
Himalaya, mutații sensibile la temperatură , 101
Poliribozomi observați la microscop electronic, 386

de secvențe intercalate în gena β-globinei, 367
Conformație
anti-terminator, 459
implicit, 459 terminator, 459
Conjugare, 157-159
Comutare polimerază , 310 Consangvinitate, 66
Consangvinitate, 389
Conservare *ex situ* (creștere în captivitate), 819-821
și bănci de gene, 821
Constitutiv
enzimă, 444
mutație, 446
Continuitate genetică, 20, 295
Control negativ, 444
modelul operonului, 447-450
sistem cu reprimabilitate scăzută, 454
și controlul pozitiv exercitat de proteinele reglatoare , 460-461
Control pozitiv, 444 exercitat de CAP asupra operonului *lac* , 450-452
transcripția sistemului genetic *GAL* la drojdie , 482
și controlul negativ exercitat de proteinele reglatoare. 460-461
Conversia genetică, 316
Copie în *Drosophila,* 434
Copolimeri de ARN
amestec de, 351
care se repetă , 353-355
Corey, Robert, 398
Corpuscul
a cromatinei sexuale, 201
polar, primul și al doilea, 36, 38
Corectarea erorilor de replicare , 416 Correns, Cari, 58.242
Represor, 454
Tribunal co-transcripțional , 366
Cosegregare, 749
Cotransducție, 174
Cotransformare, 168
Covarianță, 740
CpG , 572
CpG, insulă, 334.474.572 hipermetilare, 578
Creștere
a populației bacteriene, 155 exponențială, bacterii, 155
Creighton, Harriet, 136
Fermoar simplu cu leucină (bZIP), model, 480
Creste genitale , 197
Boala Creutzfeldt-Jakob, 401
Creșterea în captivitate, 819-821
dihor cu picioare negre, 820
Crick, Francisc, 7.261.274
cod genetic degenerat și fără virgulă , 349
ipoteza degenerării și oscilației, 355-356
Structura dublei spirale a ADN-ului , 274, 276-280 studii privind mutațiile de schimbare a cadrului de citire , 348
moleculă adaptoare în sinteza proteinelor , 349
replicare semiconservativă a ADN-ului , 296
Crizotinib de la Pfizer , 558
Croce, Carlo, 235
Boala Crohn , 229
Cromatide surori, 24, 41
aliniere, împerechere și disjuncție în mitoză , 29
definiție, 27 dicentric și acentric, 230
disjuncție în timpul anafazei mitozei , 29
în meioză, 35
în mozaicul de origine paternă și maternă, 34
Cromatide non-surori, 34
Cromatină, 21, 330-335
în interfaza ciclului celular, 38, 39 structură și nucleozomi, 330-333 heterocromatina, 334
modificări care influențează expresia genelor eucariote , 473-475
replicare prin , 310 și epigenetica cancerului , 526
Cromomeri, 33, 328, 329
Cromozomul Philadelphia, 525 de cromozomi
cromozomi artificiali bacterieni (BAC), 607
cromozomi artificiali de drojdie (YAC), 607
benzi în cromozomul mitotic, 335-336
definiție, 21
complementul cromozomilor umani, gene mutante care cauzează boli , 12 echilibratori asemănători periilor sau penelor 329, 231 , 761
structura fizică în mitoză și meioză, 39-40
genomuri eucariote, secvențe complexe cu ADN repetitiv , 336-340
Imagine colorată a complementului cromozomial al unui mascul din specia umană, 5
Cea mai mare parte a genomului eucariot nu codifică gene funcționale, 340 Organizarea ADN-ului la bacterii și virusuri , 323-327
Organizarea ADN-ului în cromozomi eucarioți specializați , 327-329; Organizarea ADN-ului în cromatină la eucariote, 330-335
perechi omoloage în organismele diploide , 23-26
care determină sexul , 25 variații structurale în genomul uman , 340
Cromozomi omologi, 5,24-26,42, 58 criterii pentru clasificarea cromozomilor în perechi, 58
evenimente și rezultate ale mitozei și meiozei, 32
Cromozomi sexuali, 189. *Vezi și* X, cromozom ; Y, cromozom; compensarea dozei pentru expresia genelor la mamifere, 200-204 ; compensarea dozei pentru expresia genelor legate de X la Drosophila , 206-207
Cromozomul Y și dezvoltarea masculină, 197-199
Cromozomii X și Y legați de determinarea sexului, 193-194 Încrucișare dihibridă , 51-53
analiza , 54
analiza chi-pătrat, 63 de modificări ale raportului mendelian, 86,89-91
Raportul mendelian al dihibridismului 9:3:3:1,53
Transmisie independentă, 52-53 Test încrucișat, 50-51
două personaje, 53
un caracter, 50-51
Încrucișare trihibridă , 53-57
Reguli matematice pentru probleme de genetică , 57
folosind metoda diagramei de ramificare , 55-57
Încrucișări monohibride, 47-51
Analiza chi -pătrat , test încrucișat 63 , un caracter, schema 50-51 folosind pătratul Punnett, 50-51
mazăre rotunjită și ridată, 55 de modificări ale raportului genetic, 78-86
Treceri reciproce , 48
Încrucișări selective , 694
CT/CGRP, genă, (peptidă legată de gena calcitoninei/calcitoninei), 483
Cvartetele G, 312
Acoperire celulară , 21 Strângeri de sticlă genetic, 791
populație, 814
Corp
bazal, 23
apoptotic, 529 de întrebări
Tehnici și etică în profilarea ADN-ului, 554-555
tehnice, sociale și etice ale medicinei personalizate, 568-569
Culturi
Bt, 696
modificare genetică, 10-11 pierderea diversității , 809 *Cucurbita pepo,* forma fructului în, 58 CYP2C9 , gen, 563 *CYP2D6,* gen., 560, 561
CYP2D6/CYP2C19, genotip, 562 CYP450, test genetic cu microcip , 562

D.

D/G (14/21), translocații, 233
Danio rerio (peste zebra), 15.432.701 Daune oxidative ADN , 418

Darnell, James, 366
Darwin, Charles, 3, 57,682, 777
Originea speciilor, 818
selecție naturală, 786
Baza de date a variantelor genomice (DGV), 340
Datura stramonium (estramonio), 75, 217
Davidson, Ronald, 202
Davis, Bernard, 157
Dawson, M. Henry, 264
DCC (deletă în cancerul de colon), genă, 536
de Vries, Hugo, 58 deCODE Genetics, 2 Finger , motiv, 479 Defecte într-o singură genă, dovezi disponibile pentru, 565
Defensină (DEF), gene, 341 Deficit de G -6-PD , 97
Degradare mediată de proteine fără sens , 487
Delbruck, Max, 155, 412-413
Ștergere, teste, 179 Ștergere (sau compensare), buclă de, 225, 226
la nivel molecular, 229
Ștergere (sau deficiență), 225-226, 231
mieunatului pisicii , 226-227
rezultat din împletirea inegală, 227
Ștergere segmentară, 226
Ștergeri
interstițial, 225,226
terminale, 225, 226
Delta (sau)
ADN polimerază, 310
lanț sau, 395
Subunitatea *O a* holoenzimei ADN polimerazei III , 303
DeLucia, Paula, 302
Densitatea genelor , procariote și eucariote, 659
Depresie
endogam, 816
neendogam , 823
Drepturi de proprietate intelectuală , 727 Deriva genetică, 791-793
ca factor în speciație, 794-797
în populații mici și izolate, 814 DES (dietilstilbestrol), 581
Deaminare, 417
Dezvoltare, 498
de flori la *Arabidopsis thaliana,* 509-510
embrionare la Drosophila , 500-502 Derularea helixului ADN în timpul replicării , 304
Alunecare în timpul replicării , 416 Denaturarea acidului nucleic, 285-286 Desorbție/ionizare cu laser asistată de matrice (MALDI), 676
Deoxiribonuclează (DNază), 265
dezoxiribonucleozid trifosfat (dNTP), 301, 308
Deoxiriboză 271
Depurinare, 417 Deviație
la întâmplare, 63
tipic, 739
Detectarea erorilor și repararea asocierilor defectuoase, 425-426 Determinare, 498
sexului dependent de temperatură (TSD) , 207
Determinarea genotipică a sexului (GSD), 207 determinanți r, 166 diabet zaharat de tip II , 735
Diakinezie, 34
Diadas, 33,42
Diagnostic
de boli și medicină personalizată , 563-565
testarea genetică preimplantatorie, 707
Diagnostic genetic prenatal neinvaziv (NIPGD), 219 Dializă de echilibru , 450
Dicționar al codului genetic, 355-357
Dicentrice, cromatide, 230, 231
Dicer, complex enzimatic, 489
Dizigoți (gemeni), 67, 745. Dideoxinucleotidă (ddNTP), 621. Diferențiere, 510, 584
în testicule, 197
stimularea CME pentru diferențiere, 586
Sexuală primară, 189 sexuală secundară, 189
Diferența de selecție (S), 744
Digestie parțială, 636
Diluție serială. 156, 171
Diluții, tehnica diluției seriale, 156, 171 Dimer, 303, 307
Dimeri de pirimidină , 426
timină indusă de radiații UV , 421 reparare prin excizie de nucleotide , 428
Dinudeotidă, 273
Dioic, 189
Diplococcus pneumoniae, Experimentul lui Griffith cu, 262-264
Diploid, număr (2n), 4, 24, 58
reducerea numărului haploid în timpul meiozei , 31-35
Organism diploid
cromozomi în perechi omoloage, 23-26
importanța meiozei în reproducerea sexuată, 37
Diplotenă, 33, 34
stadiul meiozei, 34 Discordant, 746
Proiectarea rațională a medicamentelor, 719
Disgeneză hibridă , 435
Disociator *(Ds),* mutație la porumb, 434
displazie craniană , 504
Diskeratoza congenita (DKC), 318 Distanta interocus, 115
Distribuție normală, 739
Distrofie miotonică (MD), 102,424, 485
Distrofie musculară Ducheme , 97, 102,492
Gena distrofinei, 368,492
Disjuncție, 29
în meioză , 34
Ditipuri
non-paternal, 142
patern, 142
Diversitate genetică, 810-813
conservarea, pentru supraviețuirea speciilor, 819-823
definiție, 810
identificare, 812
pierdere de, 8 1 1
Diversitate interspecifică, 810
Diversitate intraspecifică, 810 Diviziune reducțională, 33
DMPK, generația 485.492
DnaA, DnaB și DnaC, proteine, 304 DNază, 172
hipersensibil la, 482
I, enzimă, 562
Dublă fertilizare, 191
Dogma centrală a geneticii moleculare, 7.262
Domicilierea proteinelor , 400
Dominanță, 48,67
baza moleculară a genei agouti, 85
cele mai reprezentative trăsături dominante ale speciei umane, 68
codominanță, 80-81
incomplet sau parțial, 80 simboluri reprezentând, 79
Dominant, epistază, 91
Domeniu(e)
catalizatori, 403
activare în *trans,* 479
a represiunii în rândul *persoanelor trans,* 479
Legarea ADN-ului, 403 , 479-480
în formă de fundă. 331
aspecte funcționale ale factorilor de transcripție eucarioți , 479-480
homeotic, 506
proteic, 402, 647 Floare de ora patru .
Mirabilis jalapa, 242-243 Donodora, secvență, 370
Doolittle, W. Ford, 404
Dublă Helix, The, 274 *Doublesex (dsx), gen,* 486
Sindromul Down, 217-220
familie, 233-234
originea cromozomului suplimentar 24, 218-220 DPE (element promotor din aval), 476
Dressier, David, 316
Drosophila, 13, 14, 498-506
ADN mitocondrial , 250
ADNr și redundanță genetică, 227
Analiza complementării mutației fără aripi, 93-94
analiza dezvoltării embrionare , 499-502
analiza transcripțională a expresiei genelor, 675
Învățare și memorie, 764
CEN, regiune, 338
culoarea ochilor normală și mutantă , 6
culoarea ochilor, mutații, 79, 390
compensarea dozei în, 206-207 splicing alternativ al genei *Dscam* , 484
splicing alternativ al genei *Para* , cromozomul X 485, 5
determinarea sexului în, 204-206
determinarea sexului și reglarea splicingului alternativ, 485-487 diversitatea nucleotidelor

într-o genă, 778-779 efectul poziției pentru mutația recesivă legată de X a culorii ochilor albi , 100 efectul matern asupra dezvoltării embrionare, 254
elemente transpozabile, copie și P, 434-436 studiu al moștenirii în, 6 expresivitatea mutației fără *ochi* , 100 gene cartografiate pe scară largă, 132 gene zigotice programează formarea segmentelor în, 502-504 gene implicate în transmiterea impulsurilor nervoase, 763 gene multicopie, 340 gene selectoare homeotice *(hox)* , 505-508
genetică comportamentală, selecția geotaxiei în, 759-762
genom, 649
moștenirea culorii ochilor, 92-93 inserții de transpozoni, 432.436 schimb fizic între cromatide la crossing over, 136 interferență la crossing over, 132 legătură X la, 95-96 *locus alb, alele prezente la, 84* hartă în trei puncte la, 123-125 *melanogaster,* 13,14.432 monosomie la, 216 mozaicuri, 207 mutație Bar, 228 mutații în genele de reparare a nepotrivirilor , 425 mutații recesive legate de X induse de raze X , 421 nudeosomi, 331 politeni, cromozomi, 327, 328 pseudogene, 340 calea de semnalizare Notch , 5)1-512 selecție disruptivă, număr de cote, 789 simboluri pentru trăsături de tip sălbatic și mutante , 79
rata mutației spontane, 411,412 utilizarea în studiul bolilor umane, 15
Drosopterina, 92
Dscam, gena Drosophila *,* splicing alternativ, 485
DuPaw, Ernest, 39 de ani
mutație *bar* la *Drosophila,* 228 redundanță și amplificare genică, ARNr, 227-228

ŞI

E (ieșire), amplasament, 384
£. coli, 13, 14, 159-162. *Vezi și* Bacterii; bacteriofagi
lanț mutant deficitar pentru dig ligază *),* 306 diviziunea celulară , 22
studii care dovedesc existența ARNm , 359 experimente de transfecție cu, 267-269 faza de elongație a translației, 384 gene și produsele acestora în replicarea ADN-ului , 308
; structura Holliday, 3 ; 15 infecție cu bacteriofag Tl , mutații, 412-413
Inițierea traducerii , 383 Material genetic , 325 Experimentul Meselson-Stahl, 297-298 Metabolismul lactozei , reglare prin sistem inductibil, 445-450 Mutație în replicarea ADN-ului, 307 Mutații bacteriofage , 174 Mutații de schimbare de fază, 348 *Mutații ale genei trpA,* colinearitate cu aminoacizii afectați din proteine, 396 Reglarea operonului ara, 460-461 Repararea prin fotoreactivare , 426 Replicarea ADN-ului, 299 Ribozomi examinați în timpul traducerii folosind crio-EM, 387
Sistem de reparare SOS , 426 rată de mutație spontană , 412 transcripție și traducere în, 371 transducție, fagi, 172 utilizare în studiul bolilor umane , 15
Ecosisteme, 810
Epoca de aur a culturii grecești , 3 Edgar, Robert, ediția 169
ARN, 370-371, 485 prin deleție a ARN, 370 prin inserție/deleție, 370 prin substituție, 370 sindrom Edwards , 220 efect de poziție , 100, 335 fitness biologic , 787 selecție și, 787-788 *Originea speciilor* (Darwin), 4, 777, 818 electrofocalizare, 673 electroforeză, 288, 394 capilaritate, 547, 548, 623 în gel, 547, 548, 623 în gel bidimensional , 673-675 în gel de agaroză , 617 în gel de amidon , 394 în gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu , 674 Spectrul electromagnetic, 420 Electroporare, 166, 605 Element
bazal (BLE), 479
răspunsul glucocorticoid (GRE), 479 răspunsul metalelor (MRE), 479 răspunsul factorului AP (ARE), 479 elemente
Controlere mobile, 434 trans-acțiune, 445, 449 elemente ADN cis -acțiune , 362, 363, 364
Gena HA a metalotioneinei umane , 478 Elemente dispersate scurt (SINE), 339, 436 Elemente dispersate lung (LINE), 339, 436-437 Elemente transpozabile sau transpozoni, 55, 418.433-437, 573 de copii și elemente P în *Drosophila,* 434-436 la oameni, 436 inserție pentru a induce mutații, 432 mutații, evoluție și, 436 secvențe de inserție și transpozoni bacterieni, 433-434 sistemul Ac-Ds la porumb, 434 eliptocitoză, 132 complex de elongație, 48 1 din lanț, 301, 361, 362 fază de translație, 384-386
ELSI (Implicații etice, juridice și sociale), program, 649.725
Elymus canadensis, 44 Joncțiune alternativă, 206, 370, 483-487, 650
de ARNm, 483-485 determinarea sexului la *Drosophila,* 485-487
și boli umane , 485 splicing ARN , 206 , 483-485
și distrofie musculară , 492 Potrivire non - aleatorie și modificare a frecvențelor genotipice , dar nu și a celor alelice, 793-794
Nanism (achondroplazie), 423.439.790
Encefalopatie spongiformă bovină boala vacii nebune), 401 Enciclopedia Elementelor ADN (ENCODE), proiect, 655
Consangvinitate, 793-794, 815-817 coeficientul (F), 793, 794 , 815, 816 Endonucleaze, 314, 330, 425
Endonudează AP, 427 Endopoliploidie, 224 Ipoteză endosimbiotică , 23 Energie de activare , 402 Boală
a bolii vacii nebune, 700 moleculare, 395 Boli ale creierului cauzate de proteine pliat greșit , 401 Boli umane cauzate de mutații în ADN-ul mitocondrial , 250-252
splicing alternativ , 485, 492 studii de asociere la nivelul întregului genom , 715-718
genomuri procariote responsabile pentru , 658
boli ereditare cauzate de gene mutante , 12
Identificarea genelor bolilor în cadrul Proiectului Genomului Uman . 651-654 Model bazat pe biologia sistemelor privind interacțiunile genelor în 682 de organisme model utilizate în studiul . 15
care apar din mutații într -o singură genă, 422-424
Boli genetice la specia umană, gene *Hox* și, 508

Tulburări de amprentare. 576 Boli metabolice, studii asupra acestora, 389-390
alcaptonurie. 389
cale metabolică ce implică fenilalanina și tirozina. 389
Legătură
fosfodiester, 273
Peptidă, 398 Legături încrucișate, 34
ca bază pentru determinarea distanței dintre gene în cartografierea cromozomilor, 118-122
Definiție, 31, 115
dublu (recompensare), 122
implică schimb fizic între cromatide, 136
incapacitatea de a detecta toate, 131
interferență în, 131
investiții și, 229-23 1 multiplu, 122-123
simplu, 121-122
Îmbătrânire
cancere legate de vârstă, 524, 526 sănătatea speciei umane și mitocondriile, 251
telomeri și 317
EnviroPig, 701 Enzime, 8
adaptiv și constitutiv, 444
murătură, 487
de fotoreactivare, 426
de restricție, 9.602-603, 636
în recombinarea ADN-ului, 314 facultativ, 444 funcțional, 402
ipoteza unei enzime gemuna, 390-393
histon acetiltransferază (HAT), 473,573, 578
proprietăți catalitice ale, 402 *Ephestia kuehniella* (molia făinii) , efect matern asupra, 252
Ephrussi, Boris, 244, 390
Epigeneză, 3
definiție, 86
Epigenetică, 203, 570-582
modificări ale genomului, 572-574 definiție, 103, 571
începutul anului 572
modificări ale cromatinei și epigenetica cancerului, 526 remodelarea cromatinei, 334
și cancer, 577-579
și comportament, 579
și diferențele dintre gemenii monozigoți, 746
Epigenom, 571
și amprentă, 575-576
proiecte, 582.655
și mediul înconjurător, 581-582 Epimutații, 575 Epizomi, 166 Epistază, 87-91
dominant și recesiv, 91
Moștenirea culorii blănii la șoareci, 90
Epsilon («)
ADN polimerază, 310
lanțuri c, 395
Subunitatea e a holoenzimei ADN polimerazei III , 303 , 306
EPSP sintasa, 696
Virusul Epstein-Barr, 537
Era Geneticii , 15-16
Erbitux', 559
a expresiei genelor la ariciul de mare *(Strongylocentrotus purpuratus)* , 672
Genom, 662-663 Eroziune genetică, 818-819 Eroare medie tipică, 740 Gândacul făinii , moștenirea culorii, 90 Scleroză laterală amiotrofică (SLA sau boala Lou Gehrig), 591
Școala de Medicină Hipocratică, 3 *Escherichia coli. Vezi E. coli*
Sferoplastos, 269 Speciație, 777,794-797
schimbări care duc la, 796
mecanisme de izolare reproductivă, 795
rata macroevoluției și, 796-797 Specii, 794
diversitatea inter- și intraspecifică, 810
efectele creșterii populației umane , 810
specii reactive de oxigen (ROS), 250, 418
supraviețuire, amenințarea eroziunii genetice, 818-819
Specificații, 498
Spectru
absorbție, 269
Lumină de acțiune (lumină UV), 269
Spectrometrie de masă , 675-677, 679
în tandem, (MS/MS), 677 Spermă, 35
Injecție intracitoplasmatică de spermatozoizi , 576 spermatide 35 spermatocite
primar, 35,38 secundar, 35, 38
Spermatogeneza, 35-37 Spermatogonium, 35, 38 Spermatozoizi, 35
Spermiogeneză, 35
boli umane, 41 Măduva spinării, leziuni la, tratament cu celule stem, 594-595 Spliceopatii, 485 Spliceozom, 368 Spori, 21,31 Sporofitic, fază, 38, 39
Porumb, 191 Schizofrenie, 768-771 Starea F' și merozigoți, 164-165 Structura dublă helix a ADN-ului, 7, 274, 275-280
lanțuri antiparalele, 276, 305
diagramă, 277
Helix dublu stângaci în ADN-Z, 281
Structura Lariat în splicing , 370 Structura primară, 398
Structură secundară, 398
furculiță , 363
Studii de asociere la nivelul întregului genom (GWAS) , 715-718,769
Ela (>/), ADN polimerază, 310 Etilmetan sulfonat, 420
Eubacterii, 22
Eucariote, 8
ADN-ul ca material genetic, dovezi care îl susțin, 269-270
ADN organizat în cromatină, 330-335
cromozomi specializați, variații în
organizarea ADN-ului , 327-329 capete cromozomiale liniare , probleme în timpul replicării, 296, 311-314
reglarea expresiei genelor, 468-496
replicarea ADN-ului , 308-31 1 replicare semiconservativă în, 298-301 celule eucariote , 22
Eucariote, organisme, 22
Eucromatina, 334
Euploidie, 215 Evoluție
amestecarea exonilor în timpul, 403-404
Charles Darwin, teorii ale, 3 conservarea mecanismelor de dezvoltare , 499
a familiilor multigenice , 664-666
divergență evolutivă în genele homeotice , 510
filogenie utilizată pentru a analiza istoria , 797-802
selecția naturală modifică frecvența alelelor, 786-789
Neo-darwinismul, 777, urmărind amprentele genetice umane până în Africa, 802-803
teoria variației continue, 57 transpozoni, mutații și, 436 avantajele inversiunilor, 231
Evoluție prin duplicare genetică, 228 Excizie, reparare prin, 427-429 Exoni, 367-370, 643-645
Exonuclează, 425
Expansiuni repetitive ale trinucleotidelor , 423
ExPASy (Sistem expert de analiză a proteinelor), 405, 437
Experimente de transfecție, 267-269
Expresie
a informațiilor, 261 genă specifică țesutului , 491-492
Expresia genelor, 7-8 analiză globală, 668-672 aplicarea cipurilor ADN pentru, 714-715 inițierea, 101-102 efecte multiple ale unei singure gene, 94-95 mutații în reglarea , 415 reglarea la eucariote, 468-496 reglarea la procariote, 443-467 regiuni care se suprapun și conțin produse genetice diferite. 503

Expresivitatea genotipurilor mutante, 99
Extensie (în PCR), 613
Capete coezive, 603
Capete liniare ale cromozomilor , replicarea ADN-ului, 311-314
terminație 3”, 311 terminație 5’, 31 1

F (fertilitate), factor, 157-159
Ca exemplu de plasmidă, 165
Celule F' și F, 157-159
Bacterii Hfr și cartografierea cromozomilor, 159-162
recombinare la încrucișări, 162-164
F1 și F2 (prima și a doua generație filială), 47
Fabbri, Muller, 235
Fabrica de transcrieri , 473
Boala Fabry, 97
Factor
factorul de creștere asemănător insulinei 2 (Igf2), 103, 576
de creștere epidermică, 404
de fertilitate. Vezi F, factor; F+ și F-, celule
de determinare testiculară (TDF), 198
Eliberare dependentă de GTP, 385, 386
terminație rho (p), 363
Factor de transfer al rezistenței (RTF), 166
de factori
de actorie în *trans,* 475
Asamblarea cromatinei (CAF), 311 inițiere, 383, 384
a transcrierii performanței în *trans,* 362, 363
Factori generali de transcripție (GTF), 364
interacțiuni cu activatori din promotor , 480-481
Factorial, 62
Fagul T
infectarea unei celule de E. coli , 6
organism model, 14
Fagi, 168. *Vezi și* Bacteriofagi atenuați și virulenți, 170 definiție, 6
Eroarea procurorului , 553
Familie(i)
alfoid, 338
genetic, 229
multigenic, 664-666 Farmacogenomică, 557,652,655
optimizarea terapiilor medicamentoase, 557-560
Medicamente, reacții adverse, 560-563
Faza de citire , 348.436
ORF (cadru de citire deschis) , 358.643
Faza sporofitică diploidă, 37, 38
porumb, 191
Fază staționară, 156
Faza gametofitică haploidă, 38,39
porumb, 191
Faza logaritmică (logaritmică), 156 Feinberg, A. R, 577
Fenilalanină
hidroxilază, 390
calea metabolică la care participă 390
Fenilcetonurie, 101, 390
Expresie fenotipică , 99-103,104
Fenotipuri, 6, 49
alterare prin alele, 78-79 calcul în încrucișări trihibride, 57-58 clase reciproce de, 125
Legătura dintre genotip și fenotip, anemia falciformă, 8
de tip sălbatic, 78, 123 definiție, 6 diagramă folosind pătratul Punnett, 50-51
studii multifactoriale utilizând QTL, 747-750
gene multiple care afectează , 86-93 mutații care afectează, 414-416
FHIT (triada fragilă a histidinei), genă, 235
fibre fusiforme
definiție, 23
organizarea în timpul mitozei, 29
Fibre roșii rupte în mușchiul scheletic , MERRF, 250,251
Fibroblaste, 589
Fibroină, 399
Fibroză chistică, 72, 135,423,707-709,778
Fiers, Walter. 357
Filogenie pentru analiza istoriei evolutive, 797-801
Construcția arborilor filogenetici din secvențe de aminoacizi, 798
divergența genetică dintre neanderthalieni și oamenii moderni, 799-801 ceas molecular care măsoară viteza schimbării evolutive, 798-799
Finch, John T.» 331
Fink, Gerald, 222
Finnegan, David, 434
Fisher, Niels, 387
Flavell, Richard, 367
Flemming, Walter, 57, 329
Flint, Jonathon, 759
Fluxul de informații , 261
ARN ca moleculă intermediară în, 359
Flux genetic, frecvențe alele și, 791 reducerea, 817 redusă ca factor în speciație, 794-797
Fundal genetic, efectul poziției 100, 100
pentru Alimente și Medicamente (SUA), 690
Ford, CE, 194
Formilmetionină (fmet), 383, 388 Fosforilare de aminoacizi în histone, 334.573 oxidativ, 25 1
Fotosinteză, gene pentru cloroplaste, 247, 248
Fragmente contigue (contigue), 636
Franklin, Rosalind, 274.276
Fraser, Dean, 269
Forță brută, clonare prin, 636-64 1 Fondator, efect, 791-793,8 14

G, benzi, 335
G0, fază, 27
Gl (gapl). 26
Gl, cicline, 222
Gl/S, punct de control, 31
G2 (gap I), 26
G2/M, punct de control, 31.528
Ga80p (proteina Ga80), 482
GAL, sistem genetic , la drojdie, 482–483 Gal3p (proteina Gal3), 482
Gal4p (proteina Gal4), 482 Galactozemie, 101
Gall, Joseph G.. 31 1.337
Găini
Expresia genei *Hox ,* 508 moștenirea formei crestei , 106 moștenirea culorii, 90, 92
moștenirea limitată de sex a penajului , 98-99
heteroduplex, ovalbumină, 367 amplificator între gena // - globinei și gena e-globinei, 477 ovalbumină, genă, 367
Gametofitic, fază, 38, 39 porumb, 191
Gameți, 21 calcularea tipurilor formate în încrucișări trihibride, 57 clase reciproce de, 125
consecințele inversiunilor în formarea, 230-231
dezvoltarea, spermatogenezei și oogenezei, 35-37
formarea meiozei și, 5, 31, 58 formarea în încrucișări trihibride, 55 haploizi formați prin meioză, 35, 59 paterni, 1 15
Gamma (y),
ADN polimerază, 310 lanțuri, 395
subunitate a ADN polimerazei III, holoenzimă, 303
Raze gamma , 421, 538
Mutații de câștig de funcție ale alelei blănii galbene 78.415 la șoareci 85
genelor GAP 500, 502, 503 în embrionii de Drosophila , 503
Gardasil, vaccin subunitar, 692
Garrod, Archibald, 389-390
Pisici cu carapace de broască țestoasă și pisici calico, 202
Pisici siameze, mutație sensibilă la temperatură, 101
GC, cutie, 477.643
PIB (guanozină difosfat), 531
Gearhart, John, 585
Gel de păr, 623.638
Gemeni identici, 66.745-747 studii despre, 746-747 limitări, 746
Gemeni, monozigoți și dizigoți, 66-67 Gena

metalotioneinei ILA *(hMTIIA),* 478 marker selectabil, 603 represor, 446, 448-449 GenBank, 641
Genealogii, 66-68, 74 analize, 67-68, 70
caractere care reflectă legătura genetică, 132
daltonism roșu - verde , 98 de legăminte, 66-67
Moștenire recesivă legată de cromozomul X , 97 parțială pentru fenotipul Bombay, 82
Generare spontană, 3 Generatori epigenetici, 57
1 Gene, 49
a polarității segmentelor , 500, 501, 503- 504
în cromozomii omologi în timpul meiozei , 59
factori unitari precum, 58 fragmentat, 367
ipoteza unui lanț polipeptidic gemuna, 393
ipoteza unei enzime gemuna, 390-393
ipoteza unei proteine gemuna, 393 omologi, 647 identificare în Proiectul Genomului Uman, 651.652.653 multicopie, 336 natura chimică a, 6 brevete, 727 predicția funcției prin analiza secvenței, 646-647 secvență de nucleotide, colinearitate cu secvența de aminoacizi a proteinei, 395
Utilizarea mutațiilor de către geneticieni pentru studiul variantelor 432-433 care afectează răspunsul la medicamente 560-563
Genele și bolile, site web, *Centrul Național pentru Informații Biotehnologice* (NCBI), 145
genelor cu regulă pară , 501, 502, 503 în *Drosophila,* 504
Genele de segmentare , 501 la *Drosophila,* 502-504 la șoareci și oameni, 504
Genele structurale, 445-446 în *operonul lac,* 445-446
Genele selectoare homeotice, 501.502, 504- 508
divergență evolutivă în, 510 în *Arabidopsis (* plantă de muștar), 509-511
Genele suprapuse, 358
Genele supresoare tumorale , 529
p53, genă, 531-533 RBl, genă, 533-534
Legea privind nediscriminarea în baza informațiilor *genetice* , 726
Genetică
biotehnologie în, 12-13 definiție, 4
dezvoltarea, de la Mendel până în prezent, a 15
dogmă centrală, 7
istoria , 3-9
Premiile Nobel , 16
societate și, 2.16
Genetică cantitativă, 734-756
alele aditive , baza variației continue, 737
Analiza statistică a caracterelor poligenice, 738-741
caracteristici cantitative explicate în termeni mendelieni, 736-737
trăsături poligenice și variație continuă, 735
Studii pe gemeni , estimarea ereditabilității la specia umană, 745-747
Ipoteza genelor multiple pentru moștenirea cantitativă , 736-737
loci cantitativi de caractere pentru studiul fenotipurilor multifactoriale , 747-750,760
valori de ereditabilitate, 741-745
Genetica conservării , 808-827; conservarea diversității genetice , 819-823
definiție, 810
diversitatea genetică ca obiectiv al. 810-813
efecte genetice pronunțate în populații mici și izolate, 814-818 eroziunea genetică amenință supraviețuirea speciilor, 818-819
impactul mărimii populației asupra supraviețuirii speciilor , 813-814; amenințări sporite la adresa biodiversității, 809
cealaltă față a Revoluției Verzi, 824 posibila pierdere a ecosistemelor, 810 puma din Florida , 823
Genetica transmiterii , 1, 16, 78. *Vezi și* Mendel, definiția lui Gregor Johann, 46.
Genetica Populațiilor , 776-807
efecte genetice pronunțate în populații mici și izolate, 814-818
Împerecherea nealeatorie modifică frecvența fenotipică , dar nu și frecvența alelelor, 793-794
speciație cauzată de fluxul genetic redus, selecție și derivă genetică , 794-797
filogenie pentru studierea istoriei evoluției , 797-801
Mutația creează noi alele în fondul genetic , 790
selecția naturală modifică frecvența alelelor , 786-789
Legea Hardy-Weinberg, 780-782
Legea Hardy-Weinberg aplicată populațiilor umane, 782-786, urmărind amprentele genetice umane până în Africa, 802
Variația genetică în populații și specii, 777-780
Genetica dezvoltării, 497-520; analiza genetică a embriogenezei, 500-502; conservarea evolutivă a mecanismelor de dezvoltare, 499; dezvoltarea embrionară la Drosophila, 499-500; diferențierea prin cascade de acțiune genică, 498-499; genele zigotice programează formarea segmentelor la Drosophila , 502-504 ; genele selectoare *homeotice* specifică părțile corpului , 504-508 ; ipoteza activității genelor *variabile* , 499 ; interacțiuni celulă - celulă în dezvoltarea C. e.gítns, 511-514
războiul celulelor stem , 515-516 moartea celulară programată în dezvoltarea normală, 514-515
Sisteme de dezvoltare ale plantelor , 508-51
1 Genetică criminalistică, 544
Genetică, variație, 6.777-780 continuă și discontinuă, 57 detectare prin selecție artificială, 777 duplicație ca origine a , 229 în secvențe de nucleotide , 778-779 încrucișare ca origine a, 31, 34.
41
explicația nivelului ridicat de variație genetică în populații, 779 legea Hardy-Weinberg, 780-782 rezultatul segregației independente, 59-60
Alterări epigenetice ale genomului, 572-574
analiza genomului unei persoane, 566 definiție, 9, 24, 635 om, comparație cu organismul model, 660-664
secvențierea genomului uman, 567 sintetic, 701-704
de genom , 655-657 și cursa pentru obținerea genomului pentru 1.000 de dolari, 728
Genome 10K , 657 Genomică, 12, 16, 19, 61
1.634-672 analiză transcriptomică , transcriptomică, 668-672
bioinformatică, 641-645 biologie a sistemelor , 680-687 contig-uri, secvențiere prin forță brută și genomică comparativă, 683-684 epoca de piatră, 654 definiție , 635 diagnostic medical și, 704-715 structural, 636 proiectul Genome 10K, 657 genomică a epocii de piatră , 654 imprimare genetică, 102-103 mediu (metagenomică), 666-668 nouă eră a cercetării biologice, 652-654

tratamente medicale noi, mai bine direcționate, 718-724
proteomică, 672-680
Proiectul Genomului Uman , 648-652
Proiectul Microbiomului Uman, 657 de proiecte de genom personal și cursa pentru obținerea unui genom pentru 1.000 de dolari , 728 de proiecte de genom personalizat , 655-657
Resurse de internet, 18
Secvențierea ADN-ului și, 626 secvențierea prin forță brută a întregului genom, 636-64 1
și medicină personalizată, 556-569
Genomică comparativă, 658-666
Compararea genomurilor procariote și eucariote, 658-660
compararea organismelor model cu genomul uman, 660-664 definiție, 658
evoluția și funcția familiilor multigenice, 664-666
noi genomuri, 657 metode și tehnici, 658
Genomică funcțională, 645-648
predicția funcției prin analiza secvenței, 646-647
predicția funcției folosind motive și domenii proteice, 647
Biblioteci genetice
de ADN complementar (ADNc), 609-610
Genomică, 10.609 Genotipuri, 49
calcul în încrucișările trihibride , 56, 57
verificarea echilibrului unei populații , 784
definiție, 6 descoperire folosind testul încrucișat, 50-51
Potrivirea non-aleatorie modifică frecvența genotipică , 793-794
schemă folosind pătratul Punnett , 50-51
frecvență într-o populație, 780-782 legată de fenotip, anemie falciformă, 8
Geotaxia la *Drosophila,* 760-762
Parcul Gerald , 196
German, James, 137
Gibbs, Richard. 656
Gilbert, Walter, 403, 404, 450, 624
Ginandromorf bilateral , 207 Glycocalyx, 21
Gl ¡cômica, 652
Glicoproteina E-caderină, 535 Glifosat, 696
Glivec sau Gleevec, 719
de eșantionare globală a oceanelor , 667-668, 682
GloFish, 701
Glucocorticoizi, receptori, 580 Glucoprocine, 400
Goldberg-Hogness, cutie cu, 364 Gonade bipotențiale, 197
Gonochoric, 189
Gower I, hemoglobină, 395
Goya, Francisco José de, 341
Grade de libertate (dl), 63
Grant, Peter, 789
Grant, Rosemary, 789
Liber, inductor, 446
IPTG, 450
Greider, Carol, 312, 318
Griffith, Frederick, 262
experimente de transformare cu bacterii, 263
Grunberg-Manago, Marianne, 350
Grupa fosfat, 271
Grupe sanguine A BO, 81-82, 88
albinism și, 87
MN, 81
Guanină (G), 7.271.275
perechi de baze guanină-citozină, 277
guanozină
difosfat (PIB), 531
trifosfat (GTP), 273.531
Mazăre
încrucișare cu mazăre dulce , interacțiune genetică complementară, 91
Pisum sativum, Experimentele lui Mendel cu, 46-55 Guthrie, George, 269

H

H, substanță, 82
Proteină HI, 324
H19, generația 576
Haemanthus, 28 de ani
Haemophilus influenzae, 325.636
Haldane, J. B. S., 132
Hamerton, John L., 194
Hamkalo, Barbara A., 371
Haploid, număr *(n),* 5
definiție, 24
reducerea numărului diploid la, în timpul meiozei, 31-35
varietate de organisme, 25
Haploinsuficiență, 217.415 Haplotipuri, 769
Hardy, Godfrey H.» 780 Hardy-Weinberg, legea, 780-786
aplicat populațiilor umane . 782-786
Hartwell, Lee, 30 de ani
Institutul Harvard pentru Celule Stem, 591
Harvey, William, 3 ani
Hayes, William, 159, 160
Hayflick, Leonard, 317
HbA1c, 395
HbA1c 2,395
HBB, mutații în genă , 423-424
HbF, hemoglobină fetală , 395
HbS, 394
Helicasas, 304.309
Motiv Helix-turn-helix (HTH), 479 Helix Biosciences, 624
HeliScope™, secvențiator pentru o singură moleculă , 567,568
Hemicigoză, 96
Hemmings, Sally, 550
Hemofilie, 97, 436
Hemoglobină, 402.664 absența lanțurilor Phi . 373 Compoziția lanțurilor de hemoglobină umană , 395
fetal, 395
gene codificatoare umane, 229, studii care dovedesc că o genă codifică un polipeptid, 393-395, mutații, 78
mutant în anemia falciformă , nivel cuaternar de structură 8, 400
Henking, H., 193
hepatitei B , 537.692
HER-2, generația 558-559
Herceptin, 558-559
Eritabilitate, 741-745
în sens larg, 743 în sens restrâns, 743-744
estimare la specia umană folosind studii pe gemeni, 745-747 estimări pentru caractere la diferite organisme, 745
finalizat, 744
Moștenire. *Vezi și* Mendel. Gregor Johann
biparental, 25 cantitativ, 735 influențat de sex, 98-99, 105 limitat de sex, 98-99, 105
susceptibilitate la cancer, 535-536 teoria cromozomială a, 121
Moștenirea organitelor, 242-259; ADN-ul organitelor și teoria endosimbiotică , 246-247
ADN-ul în cloroplaste și mitocondrii, 242-246
ADN-ul mitocondrial și misterul Romanovilor , 255-256
mitocondrii, sănătatea umană și îmbătrânirea, 251-252
mutații în ADN-ul mitocondrial care cauzează boli umane , 250-251, 256
Organizarea moleculară și produsele genetice ale ADN-ului cloroplastic, 247-248
Organizarea moleculară și produsele genetice ale ADN-ului mitocondrial, 248-249
Moștenire extranucleară, 24 1 -259
ADN-ul mitocondrial și misterul Romanovilor , 255-256
definiție, 241, 242
efect matern , 242, 252-254 moștenirea organitelor , ADN-ul din tiroidă și mitocondrii, 241, 242-249
Moștenire infecțioasă, 242 mutații în ADN-ul mitocondrial care cauzează boli umane, 250-252, 256
Hermafrodit, 189
Frați, 66 de ani
gemeni, 66, 746
Virusul herpesului uman, 537
Hershey, Alfred, 174, 266-267
Experimentul Hershey-Chase , 266-267

Heterocaryon, 134.428
Heterozigoție, pierderea , 535 Heterozigot, 49
pentru aberații cromozomiale, 225; pentru inversiune, 230
Heterozigoți, 49, 4 14 inversiune, 230
Heterocromatic, metilare, 572 Heterocromatină, 334.573
Heteroduplex, 168, 367
Heteromorfe, cromozomi, 189
Heteroplasmie, 242, 250, 255 Heteropolimeri, 351
Hexosaminidaza A (Hex-A), 60, 81 Hfr (recombinare de înaltă frecvență), 159-164
conversia bacteriei Hfr în starea F', 164
Hibridizare, 61 1, 613
de acizi nucleici, 618-621 genomică comparativă (CGH), 711 moleculară, 286-287, 360
Hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH), 44, 337, 559, 620-621
definiție, 287
Legături de hidrogen ale, 277
Hipercolesterolemie familială, 68,423
Hipermetilare, 577
Hipermutație, 472 Hipomutație și celule canceroase, 577-579 Axa hipotalamo-hipofizo-adrenală , 580 Ipoteză
adaptiv, 155
a factorilor multipli , 736 a genelor multiple, 736-737 a tetranucleotidelor, 262, 273, 274
a unei enzime gemuna, 390-393 a unei proteine gemuna, 393 a oscilației, 356, 387
nul, 63-64, 73
Histone, 39, 3 11 , 330-333, 402
acetiltransferază, 334 categorii și proprietăți, 330 codificare genică fără introni , 368 detalii , 333, 573 deacetilazele (HDAC), 474, 578
metilarea și fosforilarea aminoacizilor , 334
modificarea, reglarea epigenetică a genelor, 573 modificări ale histonei în cromatina eucariotă, 473 modificări ale, în celulele canceroase, 526
proteine care modifică, 578
Istoria geneticii , Cronologie, 16
Boala Hodgkin , 4 1
Hogncss, David, 434
Foaie
ARNt trifoi . 381 fi pliate, 398, 399
Holoenzimă, 303, 306, 361
Holley, Robert, 380-382
Holliday, structuri, 314,315
Holliday, Robin, 314
Homo neanderthalensis, genomul și ființele umane, 663
Homo sapiens. Vezi și Oamenii, comparația ființelor cu genomul neanderthalienilor, 663
divergența genetică a neanderthalienilor, 799-801
Dimensiunea ADNmt, 248 Homozigot, 49
Homogametic, 414 Baza de date HomoloGene , 771 Homopolimeri, 351 Homunculus, 3
Ciuperca pâine . *Vezi și* Mutații mitocondriale în *Neurospora,* 244 Hormoni, 402
Horowitz, Norman, 392 Furcă de replicare , 299
Howelcr, C. J,, 102 *Hox,* gene la *Drosophila,* 505-508 Hox, gene și boli genetice ale speciei umane, 507
Genele Hox
în *Drosophila,* 505-508
și boli genetice umane , 507 *HOXD10,* genă, malformații, 517 HSD, bază de date genealogică islandeză , 2 HU, proteină, 324
Huebner, Kay, 235-236 Amprentă genetică, 544
Profilarea ADN-ului folosind regiuni STR autozomale, 546-548 Amprentă ADN moleculară , 339 Hughes, Walter, 298-299
Oameni, ființe
aneuploidie în, 220
Apoptoză, control genetic, 515 creșterea populației , o amenințare la adresa altor specii, 809 divergență genetică între neanderthalieni și oamenii moderni, 799-801 efectul fondator în populații, 791-793 elemente transpozabile, 434-436 statisticile avorturilor spontane, 220 gena HA a metalotioneinei, 478 gene de clivaj , 504 amprentă genomică în, 102 legea Hardy-Weinberg aplicată populațiilor de, 782-786 legătură ai X în, 96-97 mitocondrii, sănătate și îmbătrânire, 251-252
mutații în genele de reparare a erorilor, 425 greutatea la naștere și rata mortalității , 789 rată de mutație spontană, 411,412 Cocoșat , *gen* , 502 Hunt, Tim, 30
Sindromul Hunter, 97
Boala Huntington , vârsta de debut , 68, 69, 85, 401, gene izolate și comportament, 766-767 mecanisme ale, 767-768 model de șoarece transgenic , 767
modele de primate pentru , 772
Dihor cu picioare negre *(Mustela nigripes),* 820 reproducere în captivitate , 820
Hutchison, Clyde, III, 701

Yo

Ihtioză, 97
Identitate, valoare a, 642
Ilumina, 624
Amprentă, 203
epigenetică e, 575-576 genomică sau paternă, 102-103 patemă, 102-103 regiune de control a, 576
Impulsuri nervoase , gene implicate în traducerea , 763-764
in situ
conservare, 822 hibridizare moleculară, 337.620 *in vitro* fertilizare, 576, 586 Indels, 662 inductibil, 444, 482 care reglează metabolismul lactozei la *E. coli,* 445-450
Mutație indusă , 411, 419-422 agenți alchilanți, intercalanți și formatori de aducti , 420 analogi de bază care cauzează mutații , 419 cu radiații, componente chimice și inserție de transpozoni, 432 lumină ultravioletă (UV) , 420-421 mutageni, 419 radiații ionizante, 421-422
Inductoare, 444
gratuit, 446
Instabilitate genomică în celulele canceroase , 525-526
Infecțioase, ereditare, 242
Inginerie genetică, 688-701 animale transgenice, 698-701 probleme etice, sociale și juridice, 725 gazde animale transgenice și produse farmaceutice, 691-692 producția de insulină în bacterii , 690-691 producția de vaccinuri și plante transgenice cu vaccinuri comestibile , 692-694
Revoluția agricolă cu plante modificate genetic, 694-698 și genomica în diagnosticul medical , 704-715
Ingram, Vernon, 395
Inhibitori tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP), 535
replicării ADN-ului , 305 la origini multiple , la eucariote, 309 Inițierea sintezei ARN-ului , 362
Inițierea traducerii, 383, 384 în diferite puncte producând gene care se suprapun, 358 la eucariote, 364
Inițierea transcripției la eucariote, 468
reglare la situsuri specifice de direcționare cis , 475-478

reglare prin factori de transcripție care se leagă de situsurile de direcționare cis , 478 *480
Inițiatori epigenetici, 571
Inițiativa privind structura proteinelor (PSI), 673
Imunitate umorală, 471
Imunodeficiență combinată severă (SCID), 720-721, 722, 729
Imunoglobuline, structură 402, 469, 471, amplificator genetic 471 în lanțul greu , 4 77
Imunohistochimie (IHC), 559 Imunoprecipitare cromatină (ChIP), 647 Proiectul Innocence, 554
Inr (inițiator), element, 476
Instrumente computerizate de secvențiere a ADN-ului , 638
Insulină, producție la bacterii, 690-691.
Potențiatori (în transcripție), 363, 364. 4 78
Interacțiunea genelor, 78,86-93
complementaritate, 91 epigeneză și, 87
epistază, 87-91 noi fenotipuri produse, 91-92
raporturi fenotipice dihibride modificate , 89-90
Interacțiuni între celule în C. *elegans,* 511-514
Interactome, 681
Schimburile de cromatide surori (ICH), 137-138
Interfață
în celulele animale cu număr diploid, 4, 28
invizibilitatea cromozomului în timpul, 39
și ciclului celular, 26
Interferență, 131
de ARN (ARNi), 488.489.574.723 negative, 32 pozitive, 132
Interferon, 368
Internet
Hărți cromozomiale umane în, 145 resurse, 18
Intersex, 189, 205
Intoxicație alimentară , 461
Introni, 367-370, 643-645, 659 apariția pe scena evolutivă, 404 în diferite gene umane, 368 în gene eucariote, 367 grupa 1, mecanisme de splicing , 368
Investiții, 100, 225, 229-231
intracitoplasmatică de spermatozoizi , 576
Iota (i), ADN polimerază, 310
Izoforme, 370
Izogame, 190
Izogameți, 138.190
Izopropiltiogalactozidă (IPTG), 446.450

J

J. Craig Venter (JCVI), 702.729 Jacob, Francois, 15.160, 348, 360, 445, 454
modelul operonului , 447–448
Jacobs, Patricia, 196
Jansseens, E. A., 119
Jefferson, Thomas, 550
Jeffreys, Alec, 545
George al III-lea (Regele Angliei), 95

K.

Kappa (κ)
ADN polimerază, 310
gena lanțului ușor , 471-473 sindromul Kearns-Sayre (KSS), 251 Khorana, Gobind, 353-355
Kimura, Motoo, 779
Kinzler, K. W., 524
Sindromul Klinefelter, 194-195, 201
Klug, Aaron, 331
Knirps, general, 502
Kohne, David, 287.336
Kornberg, Arthur, 301-302
Kornberg, Roger, 331, 365
Kozak, Marilyn, 388
Kozak, secvențe de, 388
K-RAS, generația 559
Kreitman, Martin, 778
Kruppel, gen., 502

L.

Ll, familie, 339
labială la *Drosophila,* 506
Lac (lactoză), operon, 445,447
control pozitiv exercitat de CAP, gene structurale în, 445-446
mutat, răspuns în absența lactozei, 449
Intoleranță la lactoză, 101
Întârziere, fază, 1 56
Lambda (X.)
ADN polimerază, 310
bacteriofag, 324-325,450,607 Lamelă medie, 30
Landsteiner, Karl, 81 de ani
Panglică
anticodon, 382
de investiții, 230
de represiune, 453-454
LDL, proteină receptor , 403
Neuropatia oculară ereditară Leber (LHON), 251
Leder, Philip, 352, 366
Lederberg, Esther, 159
Lederberg, Iosua. 157, 158-159, 172,445
Experimentul Lederberg-Zinder , 172 Lee, Jeannie T, 203
Lejeune, Jerome, 226
Leptină, gena umană a (LEP), 647 comparație a omologilor la oameni și șoareci, 647
Leptotenă, 33
faza meiozei, 33
Sindromul Lesch-Nyhan, 97,102
Mutație letală, 415
Leucemii, 524, 530
Mieloid cronic (LMC), 525,719 mieloid acut la om, 524
Moloney murin (MLV), 720 virus limfotrop T uman (HTLV-I), 537 leucoencefalopatie cu substanță albă cu dispariție, 406
Drojdie, 14.432. *Vezi și Saccharomyces cerevisiae*
Gena CDK (kinaza dependentă de ciclină) , 80 conversie genică, 316 screening genetic, 439 reglarea expresiei genice , 444 ribozomi în translație, 389 transcripția *genelor GAL,* 482-483 zigoten în meioză , 33
Levan, Alvert, 194
Ixvene, Phoebus A., 262,274
Levin, Philip, 81 de ani
Lewis, Edward B., 254, 500
Legea adunării, 61
Legea produsului , 122 definiție, 52,61
neuropatie oculară ereditară Leber), 251
Lider (L), regiune, 471
Sindromul Li-Fraumeni , 534
Ligatură
Analiza scorului LOD , 132 complete, 115 în încrucișări genetice, 115 studii efectuate pe organisme haploide , 141-144
genetică, 86
grupuri de, 1 18 proporție de, 1 16-1 18 și Mendel, 144
Lilium tigrinum, 222
Limnaea peregra (melc), efectul matern asupra încolăcirii, 252-254
Lincoln, Abraham, 95 de ani
Lindegren, Cari, 316
Linie de frați, 66
Linii celulare , 586
Limfocit B sau celulă B. 471
rearanjarea genei în gena *K* din lanțul ușor, 471-473
Limfom difuz cu celule B mari , 713-714
Linnaeus, Carolus, 3
Ionizare, 202
Lichidul amniotic, celule stem derivate din, 587
Lizină, 251, 330
Liză, 169
Lizogenie, 170
Lizogenic, 170
Lizozim, 169.267
Listeria monocytogenes, toxiinfecție alimentară cauzată de, 461
Lupul gri Isle Royale *(Cants lupus),* 816 Locus, 25,58
de natură cantitativă (QTL), 747
Lod, metodă de notare, 132
Locuri fragile, definiție 234-235, relații 234 cu cancerul , sindromul X fragil 235 (sindromul X fragil)
Martin-Bell), 234

Lupski, faimos, 656
Luria, Salvadore, 155.174
Luria-Delbruck, test de fluctuație , 412*413
Lwoff, Andre, 15.445
Lygaeus, modul de determinare a sexului , 193
Lyon, ipoteza , 201-203
Lyon, Mary. 202

M.

M, punct de control , 31.528
Macaca mulat (maimuță rhesus)
genom, 662
model pentru boala Huntington, 772
Macleod, Colin, 6, 262, 264-266
Macroevoluție, 777
speciație și rată de, 796-797
MADS, proteine în cutie , 510
Porumb
ciclu biologic, 190-192 schimb fizic între cromatide în crossing over, 136-137
problemă de mapare , 127-130 sistem Ac-Ds, 434
Rata de mutație spontană , 411, 412
Malformații ale piciorului , 517
Mamifere, microtubuli kinctocori, 29 *Mammut americanum,* identificarea colagenului în fosilele , 677-680
Manhattan, grafică a, 716
Menținătorii epigenetici, 571
Mere, autopoliploidie, 222
Harta rețelei, 681
Hărți cromozomiale , 115 oameni pe internet, 145
Hărți de la genă la centromer , 139-141
Hărți de restricții , 617
Hărți fizice și genetice ale genomului uman , 136
Cadru deschis de citire (ORF), 358.643
Marchantia polymorpha, gene codificate de cpDNA, 247
Sindromul Marfan, 95, 41 5
Martin-Bell , 234
Masa celulară internă , 585
Raportul masă-sarcină (m/z), 676
Masculinitatea la oameni , determinarea, 194-199
Material genetic , 260. *Vezi și* ADN, caracteristicile, 261
ARN care servește drept, 270 definiție, 261
proteine precum, 262 dovezi care susțin ADN-ul, cum ar fi, la eucariote, 269-270
Dovezi care susțin ADN-ul, cum ar fi studii pe bacterii și bacteriofagi, 262-269 Efect matern , 241, 252-254
definiție, 242
dezvoltarea embrionară la *Drosophila,* 254
încolăcindu-se în cochilia melcului *Limnaea,* 253-254 pigmentare *în Ephesia,* 252
Matricea extracelulară, 534
Matthaei, J. Heinrich. 350
mieunatului pisicii , 226-227 McCarty, Maclyn, 6, 262, 264-266 McClintock, Barbara, 1 36, 434
McClung, Clarence, 193
MDM2, proteină, 488, 531, 532 Mecanism 795 izolare post - copulatorie , 795 izolare pre-copulatorie , 795 izolare reproductivă, 795 splicing , ARN-uri autocatalitice , 368
Media, 739-740 Biotehnologie în medicină, 12-13 Genomică și medicină personalizată , 556-569
Inginerie genetică și genomică, 704-715; genomica duce la tratamente noi, mai bine direcționate, 718-724
PubMed, 40 regenerative, 583 silențiere genetică indusă de ARN , 489
Medicină personalizată, 556-569; analiza unui genom personal, 566; aspecte tehnice, sociale și etice, 568-569; secvențierea unui genom uman , 567 ; și diagnosticarea bolilor , 563-565; și farmacogenomică, 557-563
Pe jumătate complet, minim 155, 155
Meioză, 5, 20,21,31-40, 42
conversia genică în timpul recombinării în, 316
Dezvoltarea gameților , spermatogeneza și ovogeneza, 35-37, 41 crossing-over. 31
crossing-over-uri în timpul, 121 structura fizică a cromozomilor, 39-40 factori, gene și cromozomi omologi, 58-59
II, 35 Importanța critică a reproducerii sexuate la organismele diploide , 37
Introducere, 31-35 Metafază, anafază și telofază I, 34 Nondisjuncție în, 215-216 Principalele evenimente în celulele animale , 36 Profază I, prima diviziune, 33-34 A doua diviziune meiotică, 35 Îmbunătățirea nutrițională a plantelor de cultură, 697 Membrană plasmatică, 21 Mendel, Gregor Johann, 3,4, 15, 45-76, 120, 777
încrucișare dihibridă, 51-53 încrucișare monohibridă , 47-49 încrucișare trihibridă, 53-57 legătură și, 144 primele trei postulate, 48 model experimental, 46 OMIM (Moștenire Mendliană Online în Man), bază de date, 69, 422 abordare analitică, 50 redescoperirea operei sale la începutul secolului al XX-lea , 57-59
Mendel, raport dihibrid 9:3:3: 1 din, modificare 53, 86
Principiile eredității lui Mendel (Bateson), 390
Merozigoți, 165.449
Meselson, Matthew, 297-298, 360 Meselson - Stahl, experiment, 297-298 Metabolismul lactozei la *E. coli,* reglarea, 445-450
Metacentric, cromozomi, 24 Metafază
I în meioză , 34, 36
II în meioză , 35,37
Metafază cu mitoză , 26, 27 cromozomi în timpul , 40 definiție, 29
Metagenomică, 652,666-668, 682 Metafeminin, 205
Metaloproteinaze, 535 Metamale, 205
Metapopulație, 817 Metastaze, 523, 535
Metilare, 572-573 5- metilcitozină, 334 ADN anormal cu repetiții de trinucleotide , 424
de aminoacizi din histone, 334.573 gene reduse la tăcere transcripțional de, 372
Metilarea ADN-ului , 103, 425, 474-475
modele modificate în celulele canceroase , 526
Metiltransferaze, 334
Metionină, 356, codon de început 388, 356
Metoda diagramei de ramificare, 55-57
obținerea raporturilor fenotipice ale unui trihibrid în F2 , 56 probabilități care implică grupa sanguină ABO și albinismul la oameni, 87
microARN (miARN), 488-489
Proiectul microbiomului oral uman, 657
Microcolecții de ADN , 13.709-712
Microevoluție, 777
Microfilamente, 23
Micrografie electronică cu scanare , 40, 329
Microsateliți sau repetiții scurte în tandem (STR), 339, 547
Microscopie crioelectronică cu particule unice rezolvată în timp (cryo-EM), 387
Microscop electronic, 21 structura fizică a cromozomilor mitotici și meiotici , 39-40
microtubuli, 23.402 kinetocor, 29 citoplasmatic. *Vezi* Microtubulii în timpul mitozei , 29
Miescher, Friedrich. 262
Migrație, 791
Miller, O. L, Jr., 371 Minisateliți, 339, 545
Mintz, Beatrice, 270 Myoglobin, 399, 402, 664

Miozină, 402 Miotonie, 485
Mirabilis jalapa (floarea de la ora patru) , 242-243 Mitchell, Herschel K., 244
Mitchell, Mary B., 244,316 Mitocondrii, 242
definiție, 23
ADN polimerază gamma (γ) , 310
moștenirea organelelor , 242 sănătatea umană și îmbătrânirea, 251-252 Mitoză, 5,20,21,26-31,41
Anafază, 29
bandare cromozomială, regiuni diferențiate, 335-336
celulele animale și vegetale , 28 structura fizică a cromozomilor, 39-40 interfaza și ciclul celular, 26 metafază pregătirea cromozomilor dintr -o celulă masculină în diviziune , 25 profază, 27-29 prometafază și metafază, 29 reglarea ciclului celular și punctele de control , 30-31, 528-529
evenimente și rezultate, 32 telofază, 30
Recombinare mitotică, 138
MN, grupă sanguină, model 81
din fibră pliată , 39
de primate pentru studiul tulburărilor umane, 772
Modificare post-transcripțională, 366, 381
Genetică moleculară, 19
dogmă centrală, 261-262 era, 7-9, 15.262
explicația motivului pentru care mazărea lui Mendel devine încrețită, 55 mutație recesivă, boală a
Tay-Sachs, 60 de ani
Molecule
alosteric, 454 receptor, 21 reglator. 444
represor, izolarea , 450
Monade, 33, 35
Maimuță Rhesus *(Macaca mulatta),* genom, model 662 pentru boala Huntington , 772
monozigoți sau identici, 66, 745-746
Monod, Jacques, 15, 348, 360, 445 , 454
modelul operonului , 447-450
Adenozin monofosfat ciclic (cAMP), 451-452
Monogenic, 422 Monoic, 189
Mononucleotide, legătură între, 273 Monozom, 379
Monosomie, 216-217 Moore, Keith, 200
Morgan, Thomas H., 16,84 Moștenire legată de X , 95-97 mutație *bar* la *Drosophila,* 228 și crossing over, 118 și teoria cromozomială a moștenirii, 97
Morton, Newton, 132
Morula, 585
Musca fructelor . *Vezi Drosophila*
Muștar, plantă *(Arabidopsis thaliana),* 15, 248, 432
Motive, 647
Motoare moleculare , 29-30
MS2, bacteriofag, 357 MTE (*elementul motiv zece),* 476 Mu *(p),* ADN polimerază, 310
Moartea celulară programată în celulele canceroase , 527-529 în dezvoltarea normală , 514-515
Müller, conducte, 197
Muller, Hermann J., 206, 228.41 1
Muller- Hill, Benno, 450
Mus musculus, 13. 14, 432. *Vezi și* Șoareci
genom, 649 ; dimensiune mtADN , 248; rată de mutație spontană , 412
Mustela nigripes (dihor cu picioare negre) , mutație 820
de histidină în *Salmonella,* 431 nonsens, 357.414, 422-423 Mutații, 261.280, 410-424
aleatoriu, 4 1 3 autozomal, 60.413 bacteriofagi, 174 bază intermediară a codonilor în triplet, 356
biochimice, 415
ciclul diviziunii celulare (EDE), 30
clasificare , 78-79 comportamental, 415
condițional , 415 conductiv, 524 constitutiv, 446
crearea de noi alele în fondul genetic, 790
schimbare de fază , 414
414
câștigului funcției , 415
de reglementare, 415, 447
înlocuire bază , 414
a unei singure gene care cauzează boli umane, 422-424 definiție, 6
elemente transpozabile care cauzează, 433-437
în celulele canceroase , 523
în ADN-ul mitocondrial care cauzează boli umane , 250-251 nanism genetic (acondroplazie), 439 epimutații, 575 fag mutant rii , 1 76
Gene, 410-424. Vezi *și* Identificarea mutațiilor folosind alinierea secvențelor, 437-438
independent în aceeași genă, 94-95 indus, 411, 419-422
letal, 415
Luria-Delbruck, testul de fluctuație , 412-413
neutru, 415 nul, 415 nutrițional, 101, 415
tranzitoriu, 524 pierderea funcției , 415 prin deleție, 423 prin inserție, 423 punctual, 414
care întrerup replicarea ADN-ului , 308
care produc codoni stop, 357 repararea ADN-ului pentru a contracara, 425-431
secvențe intercalate în gena insulinei, 367
sensibil la temperatură , 101.415 silențios, 414 fără simț , 357, 414 somatic, 413
Testul Ames , mutagenitatea compușilor, 431-432
utilizarea făcută de geneticieni a , 432-433
vizibil, 41 5
Mutații cromozomiale, 214-240, 411
aneuploidie, 215-220 deleție sau deficiență, 225-227 duplicație, 227-229 inversiuni, 229-231 situsuri fragile în cromozomii umani, 234-235
poliploidie, 220-224 translocații, 232-234
variații în compoziție și aranjament, 224-225
variații în număr, terminologie și origine, 215
Mutații spontane. 155,411-412 demonstrate prin experimentele Luria-Delbruck, 413
erori de replicare și modificări ale bazei de date, 416-419
creștere datorată deficiențelor în genele de reparare a nepotrivirilor , 425 rate la diferite loci ale diferitelor organisme , 412
Mutator, fenotip, 525 Mutageneză folosind lumina UV , 269 Mutagenitatea compușilor, teste. 431-432
Mutageni, 419-422, 432 Mutanți homeotici , 505
Mycoplasma capricolum (bacterii), excepție de la codul genetic, 357
Mycoplasma mycoides, versiunea genomului sintetic . 702-704

N

N-formilmetionină (fmet), 356.383 Nathans, Daniel, 602
Comitetul Consultativ Național pentru Bioetică, 597 Centrul Național pentru Informații Biotehnologice (NCBI)
DGV, *Baza de date a variantelor genomice,* bază de date, 340
GenBank, 641

Genes and Diseases, site web, 145
HomoloGene, baza de date, 771 PubMed, 40
Centrul Național pentru Resurse Genetice Conservare (USDA), 822
Institutul Național de Cercetare a Genomului Uman (NHGR1), 657
National Institute of Health (N1H) investigaciones con células madre y, 597-599 National Center of Human Genome Cercetare, 649
de Cercetare Farmacogenomică , 564
Roadmap Epigenomics, proiect, 582 Nature lipsit de ambiguitate a codului genetic, 347, 353 nesuprapunere a codului genetic, 347 , 349 fără virgulă a codului genetic , 347, 349 natură degenerată a codului genetic , 347, 349 și ipoteza oscilației, 355-356 Natura universală a codului genetic, 348, 357-358 excepții, 357-358
Nature, articol de Watson și Crick, 279-280
Omul de Neanderthal *(Homo neanderthalensis),* divergență genetică între oamenii moderni și, 799 genom și oamenii moderni, 663 Neel, James, 394
Nematode. *Vezi C. elegans*
Genetică neo-mendeliană, 78 Boli neurodegenerative. 401
modificări epigenetice în, 579
Boala Huntington, 766-768 terapii cu celule stem specifice pacientului , 590
Boli neuropsihiatrice, modificări epigenetice în, 579 schizofrenie, 768-771 schizofrenie și autism, tulburări înrudite , 770-771
Neurospora, 139-141 ciclu de viață, 139
conversie genetică, 316 studii care au condus la ipoteza unei enzime gemuna, 390-393
mutație nutrițională, 101, 391 mutații mitocondriale , primele studii în, 244
Neutru, mutație, 79.415
Nilsson-Ehle, Hermann, 736
Nirenberg, Marshall, 350-353
Nitrozamine, 538
Nivelul stării staționare, 487
Nondisjuncție , 34, 195, 204 variații cromozomiale ale, 215-216
Noller, Harry, 387, 388
Nomenclatură genetică , 79
Nordic, hibridizare, 618, 620
Crestătură, traseu de semnalizare , 511-512
Nu (v)
ADN polimerază, 310
corpuri, 331
Nucleaze cu deget de zinc , 723
Nucleină, 262
Nucleu, 22 enzimatic, 303, 306
Nucleoid, 22, 324
Nucleolus, 22
Nucleozidă, 27 1
5-azacitidină, 475 difosfat (NDP), 273 monofosfat (NMP), 273 trifosfat (NTP), 273
Nucleozomi, 310, 331-332 modificări ale cromatinei, 473-474
Nucleotide, 7, 262
structură chimică, 271-272
Nul, mutație, 415
Număr
acces , 64 1
de legătură, 326
Asistent medical, Paul, 30 de ani
Nusslein-Volhard, Christiane, 254.255, 500-501
Mutații nutriționale, 101.391.415

fie

grupe sanguine ABO), 81-82 O'Malley, Bert, 367
Obama, Barack, 598
Ochoa, Severo, 350-351
Ohno, Susumu, 201, 228
Ochi albi, mutant de *Drosophila,* 6 Okazaki, fragmente, 306, 308. 310 Oligonucleotide, 274 specific alelelor , 706-709
Olins, Ada, 331
Olins, Donald. 331 ùmica, revolución, 652
Oncogene, 79, 530
Test Oncotypc DX', 560
Moștenirea mendeliană online la om (OMIM), bază de date, 69.422
Ovocit
primar, 35, 38 redundanță ADNr, 227
secundar, 36, 38
Oogeneză, 35-37
Oogonio, 35, 38
Ootid, 36, 38
, 447-450 confirmare prin analiza complexului represor, 452-454 testare genetică a , 449-450
Operă, 659 represibile, 454-455
Organisme modificate genetic, plante, cum ar fi vaccinurile comestibile, 181
Organisme haploide, studii de linkage și cartografiere la bacterii, 138-144, 155
Organisme model , 1, 14-15 set modern de, 14 efectele mutațiilor asupra, 432-433 genomurilor , 14, 18, 660 utilizate pentru studierea bolilor umane, 15
oriC, 304
Originea clonală a celulelor canceroase , 526
Originea replicării ADN-ului , 299
origini multiple la eucariote, 309 ortologi, 647 *Oryza sativa,* 217 Ovare, 35
Ovalbumină, gen. 367
Ova, 35 de ani
Oxidanți reactivi, 418

p.

p, braț, 24, 226
Elemente P în *Drosophila,* 434
PI (generație paternă), 47
p53
gena supresoare tumorală, 531-533
proteine, 487
Pace, Norman, 271
Page, David, 198-199
Pictor, Teofil, 194
Palindromuri, 198.602
Palmer, Jeffrey, 404
Pan troglodytes (cimpanzeu)
genom, 661 Papilomavirus (HPV 16 și 18), 537 Pachitenă, subfază a meiozei , 34 *Para,* Gena Drosophila , splicing alternativ , 485
Paracentrică, inversiune, 230
Paraloguri, 647
Dominanță parțială, 80
Pardue, Mary Lou, 336
Perete celular , 21
Boala Parkinson , 401
Particula nucleară a nucleozomului. 331, 333
Pascal, triunghiul, 61-62
Pasteur, Louis, 3 ani
Cartof, genul *Solanum, 222*
Sindromul Patau , 220 de brevete
despre ADN și gene, 727
organismelor transgenice , 11
și biologie sintetică, 729 Pattern
Moștenire încrucișată , 96
chelie la oameni, 99
Pauling, Linus, 274, 276, 394, 398
PCR . *Vezi* reacția în lanț a polimerazei
PCR cantitativ în timp real (qPCR), 616
Colorant SYBR Green și sonde TaqMan, 616
Pești modificați genetic , 236-237, 700, 701
Penetrare
de genotipuri de catâri, 99
și expresivitatea genotipului , 99-100 Penny, Graeme. 203 Penta-X, 196
Peptidil transferază, 384
Pierderi
funcției , mutații, 78, 415,432
de heterozigoție, 535
Profil
de fuziune, 285
probabilitatea , 552-553

Profiluri ADN folosind regiuni STR autozomale, 546-548
Pericentric, inversiune, 230, 23!
Permease, 445
Câini
genom, 660
îmbunătățirea destinului genetic al câinilor de rasă pură, 104-105
Greutate
de nou-născuți și rata mortalității la oameni, 789
moleculară (MW), 285
Mică, mutații, 244
neutre, 245
segregațional, 245
Peștele zebră *(Danio rerio),* 15.432
transgenic, 701
Baza de cunoștințe farmacogenomică (PharmGKB), bază de date, 564, 566 reducerea reacțiilor adverse la medicamente , 560-563
și proiectarea rațională a medicamentelor , 718-720 Phi (X), d>X174 bacteriofag, 324,325, 358,635 *Physarum polycephalum* (mucegai), editare ARN , 370
Picoides borealis (ciocănitoare cu coroană roșie), 817
Picau, Claude, 208
Pilus sexual (pilus F), 158
Cinteză medie de sol *(Geospiza fortis),* 789
Pirimidine, 271, 275, 277
tautômeros, 4 1 6-417
Pirosecvențiere, 624
Pisum sativum (mazăre), 46-55. *Vezi și* Mendel, Gregor Johann
dimensiunea ADNmt , 248
Furcă, Colin, 545
Placă
telefon mobil, 28, 30
metafizică, 29
Podele
din culturi modificate genetic, 10-11.694-698
faze sporofitice diploide și gametofitice haploide , 38,39
modificate genetic ca vaccinuri, 181.692-694
monosomie în, 215
pierderea diversității în agricultură, 809
poliploidie în, 220-224
sisteme de dezvoltare , 508-51 !
trisomie în, 217
Plasmide, 159,604-607
clonare vector plasmidic, 605
Col. 166
factorul F ca exemplu de, 165
R, 166
Ti, 608.696
Platformă de expresie, 459 Plierea proteinelor și erori în pliere. 400.700
Pleiotropie, 95,105
Pluripotențialitate, teste pentru determinarea acesteia, 587-588
Populație, 777
Poi a, enzimă, 310 Poi <5 și c, enzime, 310
Poly-A, secvență, 366,388 Poliacrilamidă, gel, 288 Poligenes, calcularea numărului de , 737-738 Poligenic, 424,735 Molia făinii (*Epheslia kueh niella),* influența maternă asupra moștenirii, 252 Polimeraze, 249
ARN polimerază, primază, 305 în replicarea ADN-ului eucariot , 309-310 în sinteza ADN-ului la bacterii, 301-304 structură cuaternară, 399
Polimorfisme
din lungimea fragmentului de restricție (RFLP), 135 , 635
analiza lungimii fragmentelor de restricție (RFLP), 705-706
polinucleotide cu un singur nucleotid (SNP), 135.550-552, 562.651.706-709 Polinucleotide, 273
Fosforilază, 350 Polipeptide, 261
Spre deosebire de proteine , 396 studii dovedesc că o genă codifică un polipeptid, 393-395
sinteză în sistemul fără celule , 350
Poliploidie , 215,220-224
alopoliploidie, 22), 222-224 autopoliploidie, 221-222 endopoliploidie, 224 Sistem de polipi adenomatoasă (APC), genă, 536
Sindromul adenomatos familial (PAF), 536
Poliribozomi sau polizomi, 371, 386
Cromozomi politenici, 327-329 Purtător de translocație echilibrat , 234 Clonare pozițională, 635 Modificare post-translațională , 400-401
Potențiozom, 481
Sindromul Prader-Willi, 104 Pre-ARNm, model al mecanismului de tăiere și îmbinare , 370
Performanță, 3
Premiul Nobel pentru Genetică, 16, 280, 318, 365 Pribnow, cutie cu, 362
Primază, 305 Primul corpuscul polar, 35 Prima generație filială (Fl), 47 Prioni, 401.700
Probabilitatea coincidenței aleatorii, 552-553
Probabilitatea, valorile lui (p), 63-64
interpretare, 64-66
Probabilități, 60-62
Calcule folosind teorema binomială , 61-62
legea adunării, 61
Legea produsului , 61.553
Probabilitatea profilului sau probabilitatea potrivirii aleatorii, 552-553 Testarea, 67
Probleme etice în testarea genetică directă către consumator, 726-727
cu celule stem, 599-600
în medicina personalizată, 568-569 în organisme și alimente modificate genetic , 724
în brevetele ADN și genetice , 727
în profilurile ADN , 554-555
în terapia genică, 727 Probleme sociale de medicină personalizată , 568-569
în inginerie genetică, genomică și biotehnologie, 724-727
Proboscipedia, genă în *Drosophila,* 506 procariote
celule, 22
compararea genomului cu eucariotele, 658-660
organisme, 22
reglarea expresiei genelor, 443-467
dimensiunea genomului și numărul de gene la anumite organisme, 659 proceduri de transfer de ADN, 287,
289
Procesivitate, 310
Profago, 170
Profază
în mitoză, 27-29
I în meioză , 33-34
II în meioză, 35
Proliferare, 523
Prometafaza în mitoză , 26,28
definiție, 29
Promotor
de bază, 364, 475, 476
element, 475-477
elemente proximale, 364.475.479 promotori, 362.475.477
centrat, 475.476
împrăștiate, 475
526 interacțiunea activatorilor și a factorilor generali de transcripție, 480-481
Insulele CpG în amonte, 573
Promotor proximal, elemente, 364 Raportul de sexe, 200
primar, 200
secundar, 200
Proporția de bărbați și femei în specia umană, 199-200
Raporturi genetice, 70
încrucișări monohibride , 47, 55
încrucișări trihibride , 56
modificări ale articolelor 78, 86, 105
Raportul mendelian al dihibridismului 9:33:1,53
Cancer de prostată, 523, 524, 538
Proteasom, 401
Proteină
activator de catabolit *(* CAP), 450-452, 454
atenuator de legare a ARN-ului trp (TRAP), 456-459
de fuziune, 691
de legătură poli-A , 487
Legătura TATA (TBP), 481
organism de reglementare care exercită control pozitiv și negativ, 460-461
Proteine, 6-8
considerat a fi materialul genetic, 262

de șoc termic. 401
de transport. 402
legătură monocatenară (SSBP) , 304
Legarea ADN-ului . 324
diferența polipeptidelor , 396 funcții diverse ale, 401-402 domenii funcționale, 402-403
în recombinarea ADN-ului , 314-317
structură, 396-400
structura cuaternară a, 399
studii care verifică importanța în ereditate, 389-390
ExPASy (Sistem expert de analiză a proteinelor), 405
ipoteza unei singure gene: un singur lanț polipeptidic, 393
o genă: o proteină ipoteză, 393 modificare post-translațională, 400-401 motorie, 29
Recombinarea Ree și bacteriană, 165 reglare post-translațională, 487-488 ribozomală, 249.379 secvență de aminoacizi, colinearitate cu secvența de nucleotide a genei codificatoare, 395
sinteza, 7,261-262
și funcții biologice, 8
Prolenor, mod de determinare a sexului , 193
Proteom, 484.672
Proteomică, 14, 405, 652, 672-680; electroforeză bidimensională în gel, 673-675; spectrometrie de masă pentru identificarea proteinelor, 675-677
Identificarea colagenului în fosilele de *Tyrannosaurus rex și Mammut americanum,* 677-680
Reconcilierea dintre numărul de gene și numărul de proteine exprimate, 673 resurse internet, 18
Proto-oncogene, 79, 529
Protoplaste, 269
Prototrof, 1 56
Protozoare ciliate. *Vezi și scindarea intronului Tetrahymena* , 368
excepții de la codul genetic, 357 Provirus, 537
Proiectul Epigenomului Uman, 582, 655
Proiectul Genomului Uman , 13, 15, 69, 136, 648-652
cercetare după încheierea acesteia , 655
origini și obiective, 649
principalele caracteristici ale genomului uman, 649-652
Revoluția „omică”, 652 tehnica clonă-clonă, 638
Proiectul Genomului Personal , 655-656
Proiectul Genomului Canin, 104
Proiectul de genomică privind cancerul, 655
Proiectul Microbiomului Uman , 655.657 de teste
de fluctuație, 155
de sintenie, 134
Dovezi
paternitate , 550
563 purtător , 563 preimplantare, 563 diagnostic, 563 prenatal, 563
Testare genetică, 705-712 bazată pe analiza enzimelor de restricție , 705-706
creșterea, în laboratoare, a 564 defectelor monogenice , teste disponibile, 565
diagnosticul bolilor și medicina personalizată, 563-565
dileme etice, 725-726 direct către consumator și reglementarea furnizorilor de, 726-727 boli detectate prin, 556 teste genetice utilizând oligonucleotide specifice alelelor , 706-709 utilizând cipuri ADN și scanare genomică , 709-712
Pseudogene, 199, 340.663 PubMed, 40
Pufuri, în cromozomi politeni, 328 puma din Florida *(Puma concolor coryi),* 822, 823
Punnett, Reginald C., 50 Punnett, tabel cu, 50-51 analiza încrucișărilor dihibride , 54
Vârfuri de rădăcină de fasole lată (*Vicia Jaba),* 299 de puncte
controlul formării fusului (punctul de control M) , 31
de ramificare (introni), 370
Puncte fierbinți, 179, 180, 412 mutație , 412
Puncte de control ale ciclului celular , 31. 528
Scor de similaritate , 642
Punctual, mutație, 414
Purine, 271, 275, 277 depurare, 417 tautomeri, 416-417

Î

q, braț, 24
Expresie QTL (eQTL), 750 Proteină QTL (pQTL), 750 QTL, cartografierea populației, 748 Quake, Stephen, 567
Keratină, 402
Chiasmă, 34,119, 136 Substanțe chimice, componente cancerigene, 538 Mutații induse de, 419-420 Test Ames pentru mutagenitate, 431-432
utilizați ca mutageni, 432
Kinaze, 30, 309, 334
anaplazic (ALK), 558 limfom dependent de ciclină (CDK), 80, 528 proteină , 525

R

R, factori, 434
R, plasmide, 166
Ridiche *(Rapharnus sativus),* încrucișare cu varză *(Brassica oleracea),* 223
Radiațiile ionizante, 421, 538 induc mutații, 432 naturale și cauzate de om , doză medie anuală , 421
Radical, grup, 396 Radicali liberi, 421
Ramakrishnan, V., 387, 388 Broască. *Vezi Xenopus laevis ras*
familie de gene, 531 proto-oncogenă, 531
Urmă
de gene, 611-612 genetice, 432 genomice, 711-712 șoareci
modificări epigenetice legate de dietă care afectează culoarea părului , 581 celule stem pluripotente , 588 crescute cu deficiențe în genele de reparare a nepotrivirilor , 425
factorul de creștere epidermică , gena leptinei 404 (ob */Lep)* și gena omologă umană *(LEP),* 647
gene de segmentare , 504 *gene hox,* 508
Genetică comportamentală , cartografierea genelor legate de anxietate la șoareci , 759
genetic , 11 moștenirea culorii blănii , interacțiunea genelor , 90-91
amprentă genomică , 102-103 mutație a culorii blănii , 84-85 separarea benzii principale și a ADN-ului satelit , 337
transgenic, 270, 698 raze cosmice, 421 *RBl* (retinoblastom), genă supresoare tumorală , 533-534, 536
Reacția în lanț a polimerazei (PCR), 546-548, 613-617
aplicații, 615-617
cicluri, 613
Proiectarea primerului , 628 limitări, 615 etape ale unui ciclu, 613 Reacții de transesterificare , 370 REBASER: Baza de date a enzimelor restrictive , bază de date, 628
RecA, proteină, 165,314-316 RecB, RecC și RecD, proteine, 316 RccBCD, proteină, 165
Receptorul factorului de creștere epidermală (EGFR), 559
Receptori, 402 Recesiv, epistază, 91 Recesiv, mutație, 432-433 bază moleculară a, 60
Recesiune, 48
analiză genealogică , trăsătură recesivă umană, 67
genei *agouti , 86* trăsături recesive umane , 68

mutații cu pierdere de funcție, 432
simboluri, 79
Recombinare, 115
general sau omolog, 314 Recombinare genetică, 157-165, 295 conjugare, 157-159 în meioză , 31 intergenic în bacteriofagi, 174-175 intragenic în bacteriofagul T4, 176-180 transducție, 170-174 transfer orizontal și vertical de gene, 157
transformare, 166-168
recombinant , 122
nedetectat , 130
Recombinază, 437 Recunoașterea antigenului , 471 Redundanță genetică , 227 Medicină regenerativă, 583 Regiune
constantă, 471
Critică a sindromului Down (DSCR), 218 a regiunii Y care determină sexul (SRY), 197 regiune specifică Y (MSY), 197 J (joncțiune). 471 netradus , 643 operator, 447 regiune organizatoare nucleolară (NOR), 22.227 promotor, 451 regiune pseudoautosomală (PAR), 197
Registrul de Testare Genetică (GTR), 726
Reglarea expresiei genelor la cucariote, 468-496
expresia genelor specifice țesuturilor , 491-492
factori de transcripție care se leagă de situsurile de legare cis , 480-481 inițierea transcripției , reglarea la situsurile de legare cis , 475-478 modificări ale cromatinei care influențează expresia genelor, 473-475 post-transcripționale, 483-488 care apar în orice etapă a expresiei materialului genetic , 469-470 rearanjări programate ale ADN-ului, 470 reducerea la tăcere a ARN-ului, 488-491 diversitatea sistemului imunitar și a anticorpilor , 470-471
Transcripția genei *GAL* în drojdie, 482-483
Reglarea expresiei genelor la procariote, 443-467
CAP exercită *un* control pozitiv asupra lac operanului , 450-452
Analiza complexelor represive confirmă modelul operonului , 452-454
ca răspuns la condițiile de mediu, 444
Intoxicație alimentară și expresie genică bacteriană, 461
operonul *ara* controlat de o proteină reglatoare care exercită control pozitiv și negativ, 460-461
operonul *trp* (triptofan) în *E. coli,* sistemul genetic reprimiol , 454-459 ribocomutatoare folosind ARN senzor de metabolit, 459-460
sentimentul de colectivitate la bacterii, 462 sistem inductibil care reglează metabolismul lactozei la E. *coli, 445-450 reglare post* - transcripțională, 483-488 controlul stabilității ARNm , 487 splicing alternativ al ARNm , 483-485
tăiere și îmbinare alternativă și boli umane, 485 determinarea sexului la *Drosophila,* 485-487
reglarea translațională și, 487-488 Reglarea, mutația , 415 descoperire în metabolismul lactozei de E. *coli,* 446
Regulator de conductanță transmembranară al fibrozei chistice (CFTR), 707.778 Ceasuri moleculare , 798
în gena hemaglutininei gripale A, 800
Remodelarea cromatinei, 333-334, 363
repoziționarea sau eliminarea nucleozomilor, 474
Renaturarea acizilor nucleici, 285-286
Rearanjamente programate ale ADN-ului, 470
Reparare
erori de potrivire, 425, 526
de rupturi duble ale lanțului (reparare DSB), 430
de țesuturi cu celule stem, 593-594
a țesutului cardiac cu celule stem, 592-593
prin divizarea bazei (BER), 427-428
prin fotoreactivare, 426
prin recombinare omoloagă, 426.430 post-replicativă, 426
Repararea prin excizie a nucleotidelor (NER), 428
și cancer, 526
și boli umane, 428-429 Repetiții
de trinudeotide, 235.423-424.767
în tandem, 380
număr variabil de curent continuu în tandem (VNTR), 339, 545-546
Repetiții terminale inversate (ITR), 433
Repetiții scurte în tandem (STR), 339 Profil STR al cromozomului Y , 548-549 Profiluri ADN utilizând regiuni STR autozomale, 546-548
Repetare directă a terminalului (DTR), 435
Repetiție, 261
bidirecțional, 299
conservator, 296, 297 control printr-o varietate de gene la bacterii, 308
probleme complexe în detectarea și corectarea erorilor în timpul, 304-307
dispersiv, 297.298 erori de replicare și alunecare, 416 eucariote, 308-311
capete cromozomiale liniare, 311-314 model rezumat , 307-308 cromozomi politeni, 328
reparare post-replicativă, 426 semi-conservativă pentru ADN, 280, 296-301
Replicón, 299
Izoma Repi, 304, 305
Represia prin catabolit, 450-452
Represoare, 480
L-a reprimat, 444
Reprogramarea nucleară a celulelor somatice, 589
Respirație aerobă, mutații mitocondriale în *Neurospora,* 244
Răspuns de selecție (R), 744
Reticulul endoplasmatic (RE), 23 eucariote, secreția de proteine nou sintetizate în, 388
Retinită pigmentară, 15
Retinoblastom, 533-534
(pRB), proteină, familia 533-534, 533
Retrotranscripție, 271.312
Retrotranspozoni, 339
Retrovirus, 271, 536, 722
transformare acută , 537
Rev 1, ADN polimerază, 310
Revoluția Verde , 750, 824
Rh, antigene, 132
Rho (p), factor de terminare , 363 Comutatoare de riboflavină, 459-460
Senzor de metabolit ARN utilizat de, 459-460
Ribonuclează (RNază), 265
ribonucleoproteine, 312 proteine nucleare mici (snRNP sau snurps), 369
Ribonucleozide difosfat, 351
Ribosa, 271
Ribozomi, 7, 282. 379-380
cloroplast, 248 comparație între ribozomii eucarioți și procarioți, 269
componente, 379-380 disociate în subunități mari și mici, 384
structura cristalină a ribozomului eucariot 805, 388
eucariote, traducere, 388 organite și citoplasmă, 249
Ribozime, 368, 384
Richmond, Timothy, 333 r///, locusul fagului T4, 176 analiza recombinantă a mutațiilor *rii ,* 178-179
complementare prin mutații *rii,* 177-178
hartă genetică , 179-180 dovezi ale *delației* locusului rii, 179
RISC (complex de silențiere indus de ARN), 489, 574, 723
Ritm circadian, 671
complex de silențiere a inițierii transcripției indus de ARN), 489
ARN. *Vezi* ARN
Roberts, Richard, 366

Sindromul Roberts, 341 Translocație robertsoniană, 233 Roche 454 Științe ale vieții, 624-625 Misterul Romanov , 255-256 Ruptură dublă catenară (DSB) , 31 1 RTF (factor de transfer de rezistență), 166 Sindromul Rubenstein-Taybi, 578
Rückert, J.» 329
Runt, gene, 504 Russell, Liane, 202
Căi de semnalizare în dezvoltare , 511 Calea de semnalizare Notch , 511-512 utilizată în dezvoltarea embrionară , 511
Căile neuronale ale învățării la *Drosophila,* 764-766

S

S, fază, 26, 309
Saccharomyces cerevisiae (drojdie de bere), 13, 15,432
CEN, regiuni, 338
genom, 649 microtubuli kinetocorici, 29
mutații mitocondriale, 244 poliploidie, 222
ADN-ului mitocondrial , 248
Sager, Ruth, 243
Somon modificat genetic , 699 *Salmonella,* 170
Testul Ames, utilizat pentru testarea mutagenității . 431
Experimentul Lederberg-Zinder, 172 de pepeni fără semințe. 222
Sanger, Fred. 635
Sanger, secvențiere, 62 1 -622 Satelit, ADN, 336-337
Schleiden, Matthias, 3 Schwann, Theodor, 3
Secale cereale, Secvența 44
consens, 309.362
de performanță cis , 475
fundamental în ARNr eucariot și procariot, 388
Secvență principală, 455
secvență lider 5.455 Secvențiere înaltă , 622-623,638
ADN-ului de mare randament automatizat de computer , 623, 638-641 prin dideoxinucleotide, 621-622 prin forța brută a întregului genom , 636-641
tehnica unei singure molecule reale (tSMS™), 567
Secvențe
Acceptori și donatori, 370
a ADN-ului expandabil , mutații ale, 423-424 expansiunea în ARNr eucariot, 388
inserție (elemente 1S), 433 replicare autonomă (ARS) , 309 genă, 125-127
intercalate, 366-370
nucleotidă, variații în, 778-779 reglator, 643
semnal, 400,403 transpozabil, 339-340
Segmentul hipervariabil 1 și li (HVSI și HVSII), 549
Segregare, 48
alternativ și adiacent-1, 232
factorilor din timpul formării gameților , 59
În prima și a doua diviziune, 140 de gene legate pe același cromozom, 1 15 A doua generație filială (F2), 47 Al doilea corp polar, 36, 38 Selecție, 155
artificial, 744.777 albastru-alb, 606 ca factor de speciație , 794-797 al) sexului la oameni, 209 direcțional, 788
perturbator, 789 stabilizator, 789 tipuri, 788
Selecție naturală, 4, 786-789
Darwin -Wallace despre, 786 detecție în populații, 787-788 fitness biologic și selecție, 787-788 tipuri de selecție, 788-789
Replicare semiconservativă , 280, 295, 296-301 la eucariote, 298-299
Experimentul Meselson-Stahl cu bacterii. 297-298
Model general , 296
Semisterilitate, 233 Senescență replicativă, 317
Sensibilitate la temperatură , mutație, 101, 308 415
Simț de colectivitate la bacterii, 462 Separase, 29
Serotipuri, 263
Tendința codonică , 645
Pieptene sexual redus, genă în *Drosophila,* 506
Sex letal (Sxl), gen., 486
Sex
heterogametic, 193 homogametic, 193
Sex, determinarea, 188-218
studiu de caz pentru câini, 210 ciclu biologic dependent de sex, 189-192
controlat la reptile prin variația temperaturii , 207
diferențierea sexuală la oameni, 196 la *Drosophila,* 485-487
Proporția cromozomului X în raport cu seturile de autozomi , determinarea sexului la *Drosophila,* 204-207
proporția bărbaților și femeilor la oameni, 199-200
selecția sexului la oameni, 209 Sexuală diferențiere primară și secundară , 189
reproducere, importanța critică a meiozei în organismele diploide, 37 Sharp, Philip, 366
Shine-Dalgarno, secvența, 383, 388
Shugoshina, 29
SIDA, 271.788
Sigma (tf), factor, 361
Silențioase (în transcriere), 363, 364, 478
Silențioase, mutație, 414
Sinapsă, 32
Syncarion, 134
Sindromul Down familial, 233-234
Sindromul epilepsiei miodonice asociate cu rupturi de fibre roșii (MERRF), 250
SINE *(elemente scurte intercalate), 339, 436*
Sinsheimer, Robert, 269
Sinteză concomitentă de ADN pe catenele conducătoare și întârziată, 306-307 ADN continuu, 305-306 transleziune (TLS), 310
ADN discontinuu , 305
Sintază, enzime, 249
Sintetic, genom, sistem 701-704
indexarea combinată a ADN-ului (COD1S), 554
sinteză polipeptidică fără celule în 350
genetic represibil, operon *trp* în *E. coli,* 454-455
diversitatea imună și a anticorpilor, 470-471
Loc
de clonare multiplă, 604
de la începutul transcrierii , 362.475
Situsuri de acțiune cis , 445, 449; reglarea inițierii transcripției la eucariote, 475-478; factori de transcripție care se leagă de, 478-480
Site-uri restricționate, 602, 603
Smith, California, 132
Smith, Hamilton, 602.701
SNP-uri (polimorfisme cu un singur nucleotid), 135.550-552
SOLID *(Ligare și detectare a oligonucleotidelor suportate),* 626
Sonde, 611 radioactive, hibridizare moleculară *in situ ,* 337
Expediția globală de eșantionare oceanică *Sorcerer II , 667-668, 682*
SOS, sistem de reparații, 426
Sud, hibridizare, 618, 619, 620 Spiegelman, Sun, 271, 360
Spizizen, Ioan, 269
Srb, Adrian, 392
Stahl, Franklin. 297-298
Stern, Curt, 136
STR *(repetiții scurte în tandem). Vezi* Repetiții scurte în tandem
STR. *Vezi* repetiții scurte în tandem
Strongylocentrotus purpuratus (arici de mare), genom, 662-663
Analiza transcripțională a expresiei genelor, 672 Sturtevant, Alfred H., 205,228
și intersecții, 118-120 cartografie, 120-121

Cromozomi submetacentrici, 24
subunitatea beta (/?) a holoenzimei
ADN polimerază 111, 303, 306, 308
Superbobinare, 304, 326-327 Superfamilie, 664
a genelor globinei , 664 Groove
telefon mobil, 30
mai în vârstă, 277
minor, 277
Substanța inhibitoare Müllerianã (MIS), 198
Substituție de bază, 414, 431
Sutton, Walter, 5 ani, 58 de ani
SV40, virus, amplificator al, 478
Svedberg, definiția coeficientului (S), 282
pentru clasele de ARN , 282
SWI/SNF, complex, 474
Swiss- Prot, studii de secvență de proteine, 404
Szostak, Jack, 318

T.

T4, bacteriofag. *Vezi și* Structura și ciclul de
viață al bacteriofagilor , 168 recombinare
intragenică în, 176-180
Tutun, fumat, 538
TAF (factori asociați cu TBP), 481
Tagle, Danilo, 767
Talasemie, 73 de ani
Tanksley, Steven, 749
TaqMan, sonde, 616
Rata de mutație, 4 1 1
TATA, cutie, 364.476.643
Tatum, Edward, 101.157, 159.390
Tautomeri, 416
Taxia, 760
Taylor, J. Herbert, 298-299
Boala Tay-Sachs, 60,75 exemplu de dominanță
incompletă, 80 Tehnică
a conjugării întrerupte , 161
amprentei moleculare, 395
de alăturare la triplet, 352-353 Tehnici
de bandare cromozomială, 336
de transfer, 287, 288, 545
Tehnici analitice în studiul ADN- ului și
ARN, 283-289
absorbția luminii ultraviolete (UV), 283
cinetica de reasociere și ADN repetitiv ,
287-288
comportamentul de sedimentare , 283-285
denaturarea și renaturarea acizilor nucleici ,
285-286
Electroforeza acidului nucleic , 288
Hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH), 287
Hibridizare moleculară, 286-287
Tehnologii
reproducerii asistate , 576, 585-586
secvențierii de generație următoare, 624-626
Cromozomi telocentrici, 24
Telofaza în mitoză , 26, 28 definiție, 30
Telofaza I în meioză, 34,35
Telofaza II în meioză , 35, 37 Telomerază, 3 12,
3 1 3, 317, 338
Mutații în subunitățile proteice , 318
Telomeri, 311
îmbătrânire și, 317 structură, 311
heterocromatină, 334
Replicarea ADN-ului în, 31 1 - 31 4
secvențe de ADN , 338
Tembladera, 401
Punct de topire (Tw), 285
Teorema binomială , calculul probabilității cu ,
61-62, 72
Teorie
al echilibrului genetic, 205
de) pustiu de cromozom Y uman , 199
neutralist, 779
Teoria cromozomială a moștenirii , 4-5, 16, 19,
57, 121
definiție, 5, 58
fundamente, 97
Terapie genică , 13, 720-724, 729
probleme etice, 727
linie germinală, 727
de îmbunătățire, 727
Somatic, 727
Terapii medicamentoase
modificări epigenetice ale genomului, 579
farmacogenomică și proiectare rațională a
medicamentelor, 718-720
optimizare, 557-560
reducerea reacțiilor adverse la medicamente,
560-563
Teratoame, 587
Terțiar, structură, 399
Finalizarea traducerii , 385-386
Terminator , 456 Terminalizare, 34
TERRA (ARN telomeric care conține repetiții),
338
Teritorii cromozomiale , 473 Tetradă, 32, 139
analiza tetradelor ordonate și dezordonate ,
141
analiză la *Chlamydomonas,* 141-144
Tetrahymena (protozoar ciliat), 311, 312, 314,
338
scindarea intronului la 368
Tetratipuri, 142
Tetra-X, 196
TFIIA, TFIIB și TFIID, factori generali de
transcripție , 364.480
TFIIB, element de recunoaștere (BRE), 476,
574
TF1IE, TFIIF și TFI1H, factori generali de
transcripție , 480
Institutul pentru Cercetarea Genomului (TIGR),
636 *Thermis thermophilus* (bacterii), ribozomi,
387
Tetă (0)
ADN polimerază, 310
Subunitatea holoenzimei ADN polimerazei
III , 303
Thomas, California, 371
Thomson, James, 585
Ti, plasmide, 608.696 Timp de zbor, 677 TIGR
(Institutul pentru Cercetarea Genomului), 636
Timină (T), 7.271.275-277
Adenină-timină, perechi de baze , 278
Tiopurin S-metiltransferază (TPMT), 561-562
Tip(uri)
sălbatic, alelă, 78
împerechere, 190
Tirozină, 389.391
Tjio, Joe Hin, 194
Tn (transpozoni bacterieni), 434
Topoizomeraze, 327
Topoizomeri, 327 Totipotenți, celulă, 584
Toxicogenomică, 652 Traducere, 7, 249,261,
378-409
chaperone în celulele eucariote, 401
componente, 384
efectele inserțiilor de transpozoni, 436
la eucariote, 388-389.469
etapele procesului , 383-386
instrumente pentru, 404 leucoencefalopatie
cu substanță albă dispărută , 406
modularea ratei de translație la eucariote,
470
reglementarea traducerii și a posttraducerii,
487-488
Ribozomi și ARN de transfer , 379-383
Transacetilază, 445
Transcriere, 249, 360-362
lanțul de hemoglobină fetală , 373 capturat
cu microscopul electronic , 371
a genelor *GAL* în drojdie, 482-483 definiție,
7, 261
diferența dintre eucariote și procariote, 363-
366
inițiere la eucariote, 364-365, 475-478
inserții de transpozoni și, 436 modificarea
histonei și, 573 etape incipiente la
procariote, 361 reglare la eucariote, 469
reglare translațională a, 456 transcripție
inversă, 271, 312
Secvențe intercalate în regiunile
codificatoare din genele eucariote , 366-
370
redus la tăcere prin metilare anormală, 424
sinteza ARN pe șablon ADN , 359 Transcripție,
factori ai, 198 , 363, 364, 402
pentru ARN polimeraza IID (TFIID), 480
care se leagă de situsurile care acționează
cis , reglarea inițierii transcripției , 478-480
Transcriptază inversă, 271, 339, 610
Transcriptomică, 652, 668-672
X inactiv (X1ST), 203 Transducție, 171
avortat, 173
complet, 173
de semnale, 528

generalizat, 173
l.ederberg-Zinder, experiment despre, 172
natura, 172 și cartografie, 174
Transfecție, definiție, 269 Transfer
clonare genetică orizontală , 157 clonare nucleară a celulelor somatice , 589 metodă de clonare nucleară , 1 1 clonare genetică verticală, 157
Transformare, 166-168, 536
Experimentul Avery, MacLeod și McCarthy , 264
Experimentele lui Griffith cu bacterii, 263-264
Introducerea plasmidelor în bacterii, 605
procesul de, 166 și genele legate , 168
Transformator (tra), generație, 486
Transgene, 203
Tranziție, 414
Instrument de traducere, 405
Translocație
14/21 D/G, 233
nereciprocă, 225
Reciproce, 225, 232-234 Translocații, 100, 224-225, 232-234
ARNm în timpul traducerii, 388
ARNt în timpul traducerii, 387
cromozomilor din celulele canceroase, 526
definiții, 232 puncte de inițiere diferite, crearea
Genele suprapuse, 358
reciproc, 232-233 sindrom Down familial , 233-234
Transmisie independentă, 59-60
Al patrulea postulat al lui Mendel, 52-53, care duce la o mare variație genetică, 59-60
Transposasa, 433-434
Transversie, 4 i 4
Transplantul de genom , 702-704
cromozomi umani mutanți , 12
Trichotiodistrofie (TTD), 429
Grâu *(Triticum),* hibridizare cu secară *(Secale),* 223-224
Trinucleotidă, 273
Triplo-X, 195
Triptofan, 355, 357-358
Operonul triptofanului (trp) în atenuarea *E. coli* , 456-459 ca sistem genetic represat , 454-455
Triptofan sintază, 396.454
Trisomie, 217-220
fenotip ereditar, 234 sindrom Down , 217-220
Triticale, un hibrid de grâu și secară, 224
Trofoblast, 585
Trypanosoma, editarea ARN, 370 Tschermak, Erich, 58
Tub în U Davis , 159
Tubulină, 23, 29.402
gena alfa 3C *(TUBA3C) , 644 de cancere umane și* 40
Tumoră malignă, 523
Sindromul Tbrner, 194-195, 201, 215
Tyrannosaurus rex, identificarea colagenului în fosila din, 677-680

sau

pentru Alimente și Medicamente din SUA, 690
UAS ɑ (secvența din amonte a activării genei GAL) , 482
Omniprezent, 488
Ultrabitorax, genă în *Drosophila,* 506
Lumină ultravioletă (UV), 269, 420
absorbția, 283
care provoacă cancer, 538
ultraviolete (UV), 420-421 dimer de timină dc indus , 421 inversarea deteriorării , 426 reparare prin excizie de nucleotide indusă , 428
Prag, efect, 81.235
O genă: o polipeptidă, ipoteză, 393
Genă unică , mutații într- una, 422-424 Unitate, factori, 48
Unități
de replicare (replicon), 299
de transcriere, 199
Uniune
la matriță, 361.362
de capete neomoloage , 430
UniProt KB/Swiss-Prot, bază de date cu secvențe de proteine , 404-405 Unisexual, 189
Uracil, 7.271.282

V.

Vaci transgenice , 700
Vaccinuri
atenuat, 692 pe bază de ADN , 693 inactivat, 692 producție folosind tehnologia ADN recombinant, 181, 692-694
subunitar, 692
Variabilitate genetică, 782
Variabilă (V), regiune, 471, 472 Variație
continuare, 57
discontinuu, 57
hipercromic, 285 prin mutație, 261-263
Variații ale numărului de copii (CNV), 229, 340, 651-652
Varianță, 739
aditiv, 743
aditiv, prin dominanță și prin interacțiuni, 743
mediu, 742
a interacțiunii genotip- mediu , 742
fenotipic, 741-745
genotipic, 742
Interactiv, 743
prin dominanță, 743
Vecitibix*, 559
Vectori, 9, 604
de exprimare, 607
Vezică urinară creată din celule stem umane , 595
Velculescu, Victor, 539 Vilozități coriale , 219.704
Diagramă Venn , 667
Venter, J. Craig, 636,649,655,667,701,702
Vibrio fischeri (bacterii), simțul colectivității, 462
Vicia faba (vârfuri de rădăcină de fasole lată) , 299-300 Timp de înjumătățire. 487
HIV, efect supresor al variațiilor CNV , 229
HIV. *Vezi* Virusul imunodeficienței umane
Vinograd, Jerome, 326
Variolă, virus, 291
Viruși, 168-170. *Vezi și* Bacteriofagi
ARN-ul ca material genetic, 270
ca organizație model, 14
de ADN, 536
mozaicului tutunului (TMV), 270, 325
de papilomavirus uman (HPV), 692 bacterii infectante, 6
limfotrop T uman (HTLV-1) SV40,478 , 537
mutații sensibile la temperatură în, 101
Organizarea ADN-ului în cromozomi, 324-326
rata de mutație spontană , 411,412
și cancer, 536-538
XI 74, 635
Virusul imunodeficienței umane (HIV), 271.537.720
CCR5, gena care influențează susceptibilitatea a.782-784
Deficit de vitamina A și orez îmbunătățit din punct de vedere nutrițional , 697-698
Gena VKORC1 și warfarina, 563
Vogelstein, B., 524, 577
Volkin, Elliot, 359
von Winiwarter, H., 194

V

Waddington, C.H. , 572
Walzer, Stanley, 196
Wallace, Alfred Russell, 4,57,777
conceptul de selecție naturală, 787
Warfarina (Coumadin), 563 Watson, James, 7, 261,274
structura dublă helix a ADN-ului, 274, 276-280
genom personal, 655
Proiectul Genomului Uman, 649 replicare semiconservativă a ADN-ului, 296 Watts-Tobin, R. J., 348
Weinberg, Wilhelm, 780-782
Weiss, Samuel, 360
Hibridizare occidentală , 618
White, loc specific în *Drosophila,* 83 Wieschaus, Eric. 254, 500, 501
Wilkins. Maurice, 7, 274, 276, 280
Wilson, Edmund B., 193
Sevă de vin, măr, 222
Wolff, Conducte de curent continuu , 197

Wollman, Ellie, 161 Wood, William, 169
Woods, Philip, 298-299 World Trade Center, atacuri, 551

X

Cromozomul X, 5 benzi cromozomiale pe cromozomul X
uman, 335
C. *elegans,* 193
compensarea dozei în *Drosophila, compensarea* dozei 206-207
în
mamifere, 200-203, 334, 584
descoperirea legăturii cu determinarea sexului, 193-194 la oameni, 25 inactivare în celulele canceroase, 523 non-disjuncție, 195 sindromul X fragil , 234 triplo-, tetra- și penta-X, 195-196
X , legătură cu, 78, 95-98, 105 definiție, 95
în *Drosophila,* 96-97, 100
la oameni, 97-98
X, mutații legate de, 413
recesiv indus la *Drosophila de* Radiografii .
122
X, raze, 421
dozaj și inducerea mutațiilor, 422
Xantomatină, 92
Xenopus laevis
abundența de ribozomi, 227
ADN mitocondrial, 248
Xeroderma pigmentosum (XP), 428-429 Xic (centru de inactivare X), 203
XIST (transcript inactiv specific X) , 203 Mod XX/XO *(Protenor)* de determinare a sexului , 193
XX/XY *(Lygaeus)* mod de determinare a sexului, 193

¥

Y , 5, 194-199
47, XYY, condiție, 196
dezvoltare la bărbați, 197-199 descoperirea legăturii cu determinarea sexului , 193-194
în *Drosophila,* 204
la oameni, 24,25
Klinefelter, sindrom, 194-195 profil STR,
548-549
Și mutații legate de 413
Yamanaka, Shinya, 589
Yanofsky, Charles, 396, 456-458
Yule, G. Udny, 736
Iusupov, Marat, 388

Z

Zea mays. Vezi și Mai
Rata de mutație spontană , 412
Zetă (0
ADN polimerază, 310 catene, 395
Cigoteno, 33 de ani
subfază în meioză, 33
Zinder, Norton, 170
ZNF9, gen., 485, 492
Zoospore, 190
Zuana, Pasca Della, 551
Notația ZZ/ZW pentru determinarea sexului , 193

booksmedicos.org

În această a zecea ediție a cărții *„Concepte de genetică”,* ca și în toate edițiile anterioare, au fost luate în considerare cinci obiective principale:

- Subliniați conceptele de bază ale geneticii.
- Scrieți clar și direct pentru studenți, pentru a oferi explicații ușor de înțeles asupra unor subiecte analitice complexe.
- Mențineți un accent constant pe rezolvarea problemelor și oferiți multiple tehnici pentru abordarea acestora.
- Pentru a propaga bogata istorie a geneticii, care ilustrează atât de frumos modul în care informațiile sunt dobândite în timpul cercetării științifice.
- Creați figuri color atractive, plăcute și utile din punct de vedere pedagogic, completate de fotografii la fel de utile, pentru a sprijini dezvoltarea conceptelor.

Din toate aceste motive, dorim și sperăm ca acest text să promoveze semnificativ învățarea în această materie.

booksmedicos.org

PEARSON

www.pearson.es

9*788490 353844

- Rolul cohesinei și shugoșinei în timpul mitozei și meiozei.
- Rolul TERRA în timpul replicării ADN-ului telomeric.
- Ribozomi eucarioți și traducere .
- mutațional al radiațiilor de origine naturală și artificială.
- Repararea nepotrivirilor de ADN și cancerul.
- Riboswitches și reglare genetică.

Includerea lui „X” în denumirea K12 indică faptul că această tulpină bacteriană este lizogenizată de fagul X. De fapt, acesta este motivul pentru care *mutanții* rii nu pot liza această bacterie. De acum înainte , ne vom referi la această tulpină pur și simplu ca *E. coli* . KI 2.

FIGURA 6.21 Protocol experimental pentru studii de recombinare între o pereche de mutații în același cistron. În această figură, toți fagii care infectează E. *coli* B (în balon) au una dintre cele două mutații în cistronul A, așa cum este indicat în diagrama cromozomului lor din stânga balonului.

2. Diferențiați cele trei tipuri de recombinare la bacterii.
3. Referitor la încrucișările bacteriene F^+ și F, răspundeți la următoarele întrebări:
   (a) Cum s-a stabilit că este necesar contactul fizic între celule?

uneori se folosește forma posesivă a numelor sindroamelor aponime (de exemplu, sindromul Klinefelter), în prezent se preferă forma neposesivă .

• În prezent, acest organism se numește *Streptococcus pneumoniae*.

• Din punct de vedere istoric, termenii *chihlimbar* (UAG), *ocru* (UAA) și *opal* (UGA) au fost utilizați pentru a distinge mutațiile care produc oricare dintre cei trei codoni stop.

Există alți doi aminoacizi care fac excepție de la această regulă a celor 20: selenocisteina (Sec) și pirolizina (Pyl), care sunt versiuni modificate ale cisteinei și, respectiv, lizinei. Selenocisteina se găsește în situsurile active ale unui număr mic de proteine în toate cele trei domenii ale vieții (archaea, bacterii și eucariote). Inserția Sec în polipeptide necesită un proces molecular care recodifică codonii UGA, care în mod normal funcționează ca semnale de terminare, pentru a acționa ca și codoni Sec. În mod similar, Pyl este inserat în lanțurile polipeptidice ca răspuns la codonul stop UAG atunci când este prezent intern într-un ARNm. Pyl se găsește la mai multe bacterii metanofile și, mai recent, la o bacterie care trăiește simbiotic sub pielea unui vierme anelid.

FIGURA 14.16 Structuri chimice și denumiri ale celor 20 de aminoacizi codificați de organismele vii, care sunt împărțiți în patru categorii principale. Fiecare aminoacid are două abrevieri utilizate universal ; de exemplu, alanina este desemnată prin Ala sau A.

Tehnic, inductorul este α-lactoză , un izomer al lactozei. Când lactoza pătrunde în celula bacteriană, enzima α-galactozidază transformă o parte din lactoză în α-lactoză.

• **Choi, S.M. și colab. 2007. Identificarea genei de fuziune EML4-ALK transformatoare în cancerul pulmonar fără celule mici. *Nature* 448: 561-566.**